

JOSIANE BUDNI

**Efeitos da agmatina em modelos animais de depressão e mania**

Florianópolis

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

## **Efeitos da agmatina em modelos animais de depressão e mania**

Tese de Mestrado apresentada à Universidade  
Federal de Santa Catarina como requisito  
parcial para a obtenção do título de Mestre em  
Neurociências

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis

2008

*“São fúteis e cheias de erros as ciências que  
não nasceram da experimentação, mãe de  
todo conhecimento”*

Leonardo da Vinci

## AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer:

A Deus, que sempre iluminou meu caminho.

Aos meus pais Otávio e Rosália que me deram a vida, amor, educação...e sempre acreditaram em mim, incentivando-me sempre. Sem eles nada disso teria sentido.

Aos meus irmãos Sidnei, Fábio e Araceli, que sempre me ajudaram direta ou indiretamente quando precisei. Foram meus pilares nesta contrução.

Ao André, meu amor e companheiro que sempre esteve ao meu lado, ajudando-me, dando-me amor, carinho e tendo muita, muita paciência. Sempre me tirando do sufoco e consertando as minhas trapalhadas.

A minha querida orientadora, Ana Lúcia, uma pessoa adorável, foi com ela que aprendi o que é a pesquisa e o que é ser um pesquisador. Recebi nobres ensinamentos de uma nobre professora. Tenho muita admiração por esta grande amiga. Agradeço muito por todo o tempo dedicado a nós orientandos, tendo que driblar, às vezes, a necessidade de ficar com a família (Jorge e Camila).

Ao pessoal do laboratório, Chandra, Dani, Iria, Juliano, Kelly, Luis, Manu, Mauricio, Pati e Rica. Obrigada pelo companherismo, descontração (muitas risadas), amizade... e o famoso cafezinho!

Manuzinha! Estou morrendo de saudades! Tenho tanto a agradecer...Você me ensinou, senão tudo, quase tudo no Lab. Foi também minha mestra! Você é uma pessoa muito especial...um ursinho carinhoso...tão paciente e muito, muito inteligente.

Pati, Pati... que pessoa fora do comum! É uma fonte de estórias muito engraçadas. Sou muito grata a tudo que fizemos juntas e jamais esquecerei das muitas risadas que demos juntas, e não foram poucas.

Rica...(Ri...uhm Ri...) desde a iniciação científica me incomodando... Brincadeirainha! É uma pessoa fora de sério, a mais calma que já conheci. Um amigo e tanto. Muito, muito obrigada!

Keké... De conhecidas de vista, para grandes amigas. Sempre pronta para ajudar quem quer que seja... A pessoa mais amada...A mais companheira. Muito obrigada!

Este casal que muitas vezes quebrou meu galho... pode trocar a limpeza do biotério no meu lugar? E os ratos? Sem palavras...

As pessoas que trabalharam firmemente comigo, Manu, Vinícius, Pati, Kelly, Rica e Eloísa muito, muito obrigada!

A todos que estiveram sempre torcendo por mim, muito obrigada!

Aos colegas do mestrado e do doutorado, muito obrigada!

Aos professores da pós-graduação, sempre serei muito grata!

Aos trabalhos em colaboração com os professores Adair, Mariana e Alcir!

Ao Nivaldo que está sempre “segurando as pontas”, uma grande pessoa. Muito obrigada!

Devo muito a todas estas pessoas e agradeço por cada uma delas ter cruzado o meu caminho!

Todos foram muito importantes na minha caminhada!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transtornos de humor	1
1.1.1. Depressão maior	3
1.1.2. Transtorno bipolar	11
1.2. Agmatina	17
1.2.1. Agmatina e transtornos de humor	20
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Animais	25
4.2. Drogas e tratamento	26
4.3. Avaliação comportamental	27
4.3.1. Teste do nado forçado	27
4.3.2. Modelo de mania induzido por ouabaína	27
4.3.3. Teste do campo aberto	28
4.4. Análise do mecanismo de ação antidepressivo através de estudos farmacológicos in vivo	28
4.4.1. Participação dos canais de K <sup>+</sup> no efeito antidepressivo da agmatina no TNF	28
4.5. Investigação do efeito da agmatina nas alterações comportamentais e bioquímicas ocasionadas pelo modelo de mania induzido por ouabaína em ratos	29
4.5.1. Protocolo experimental do modelo de mania	29
4.5.2. Avaliação do estresse oxidativo nos animais submetidos ao modelo de mania	30
4.6. Análise estatística	32
5. RESULTADOS	33

5.1. Efeito da administração de doses sub-ativas de inibidores de canais de K <sup>+</sup> e agmatina no TNF	33
5.2. Efeito de inibidores de canais de K <sup>+</sup> e agmatina na atividade locomotora espontânea dos animais	34
5.3. Efeito do cromacalim ou minoxidil no efeito anti-imobilidade induzido pela agmatina no TNF	36
5.4. Efeito dos ativadores de canais de K <sup>+</sup> e agmatina na atividade locomotora espontânea dos animais	37
5.5. Efeito comportamental da agmatina e LiCl no modelo animal de mania induzido por ouabaína em ratos	38
5.6. Efeito da agmatina e LiCl sobre o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína	39
5.7. Efeito da agmatina e LiCl sobre a atividade da glutathione peroxidase (GPx) no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína	41
5.8. Efeito da agmatina e LiCl sobre a atividade da glutathione reductase (GR) no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína	42
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	54
8. PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

A<sub>1</sub>= subtipo de receptor adenosinérgico

Agm= agmatina

AMPc = adenosina 3', 5'- monofosfato cíclico

Arg= arginina

ATP = adenosina 5'trifosfato

Bcl-2 = proteína anti-apoptótica

BDNF= fator neurotrófico derivado do cérebro

Ca<sup>2+</sup>=cálcio

CaMKII= cálcio calmodulina cinase II

Canais big, BK= canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de alta condutância

Canais GIRK or Kir3 = canais de potássio retificadores regulados pela proteína G

Canais IK= canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de intermediária condutância

Canais K<sub>ATP</sub>= canais de potássio sensíveis ao ATP

Canais Kca= canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup>

Canais Kv = canais de K<sup>+</sup> ativados por voltagem

Canais SK= canais de K<sup>+</sup> ativados por Ca<sup>2+</sup> de baixa condutância

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

CREB= proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc

D<sub>2</sub>= subtipo de receptor dopaminérgico

DNA = ácido desoxirribonucléico

DSM-IV = Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais

E.P.M. = erro padrão da média

GMPc= guanosina 3',5'-monofosfato cíclico

GPx= glutathione peroxidase



GR = glutathione redutase

GSH = glutathione

GSK-3= glicogênio sintase cinase 3

GSSG = dissulfeto de glutathione

Hepes = ácido n-2-hidroxietilpiperazina

HPA =eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

5-HT = serotonina

5-HT<sub>3,1A</sub> = subtipos de receptores serotoninérgicos

i.c.v. = intracerebroventricular

i.p. = intraperitoneal

i.m.= intramuscular

I<sub>1,2</sub>= subtipos de receptores imidazólicos tipo 1 e tipo 2

I1-R= subtipos de receptores imidazólicos do tipo 1

I2-R= subtipos de receptores imidazólicos do tipo 2

ISRS = inibidor seletivo da recaptação de serotonina

K<sup>+</sup>= potássio

kg = kilograma

MAO = monoamina oxidase

MAPK/ ERK= proteína cinase ativada por mitógeno /cinase regulada por sinal extracelular

MDA = malonildialdeído

mg = miligrama

min = minuto

mm= milímetro

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase = sódio, potássio ATPase

nACh= receptor nicotínico de acetilcolina

NADPH= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

ng = nanograma

NMDA = N-metil-D-aspartato

NO = óxido nítrico

NOS = óxido nítrico sintase

p.o.= via oral

pg= picograma

PKA= proteína cinase dependente de AMPc

PKB ou Akt= proteína cinase B

PKC= proteína cinase C

ROS= espécies reativas de oxigênio

SNC = sistema nervoso central

TBARS= espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF = teste do nado forçado

TREK = canais de  $K^+$  relacionado ao TWIK

TWIK= canais de  $K^+$  de retificação interna fraca com domínios P sequenciais

$\mu$ g = micrograma

$\mu$ M= micromolar

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Inibição de canais TREK-1 por fluoxetina	10
Figura 2. Vias envolvidas na metabolização de peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e hidroperóxidos orgânicos (ROOH)	16
Figura 3. Vias metabólicas da agmatina e os compostos relacionados	18
Figura 4. Esquema da participação da agmatina em uma sinapse	22
Figura 5. Esquema do protocolo utilizado para estudar os efeitos da agmatina no modelo de mania induzido por ouabaína	29
Figura 6. Efeito da administração de doses sub-ativas de inibidores de canais de K <sup>+</sup> e agmatina no TNF	34
Figura 7. Efeito de inibidores de canais de K <sup>+</sup> e agmatina na atividade locomotora espontânea dos animais	35
Figura 8. Efeito do cromacalim ou minoxidil no efeito anti-imobilidade induzido pela agmatina no TNF	36
Figura 9. Efeito dos ativadores de canais de K <sup>+</sup> e agmatina na atividade locomotora espontânea dos animais	37
Figura 10. Efeito comportamental da agmatina e LiCl no modelo animal de mania induzido por ouabaína em ratos	39
Figura 11. Efeito da agmatina e LiCl sobre o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína	40
Figura 12. Efeito da agmatina e LiCl sobre a atividade da glutathione peroxidase (GPx) no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína	42

Figura 13. Efeito da agmatina e LiCl sobre a atividade da glutathione redutase (GR) no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína

43

## RESUMO

Os transtornos de humor são transtornos mentais graves e crônicos. Muitos compostos, como a agmatina, estão sendo investigados acerca dos efeitos e mecanismos de ação na depressão maior e transtorno bipolar. A administração da agmatina, uma amina catiônica endógena, elicitou um efeito antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) em camundongos por um mecanismo dependente da inibição de receptores NMDA e da via L-arginina-óxido nítrico (NO). Tendo em vista que o NO pode ativar diferentes subtipos de canais de potássio ( $K^+$ ) em vários tecidos, o presente estudo investigou a possibilidade de uma interação sinérgica entre diferentes inibidores de canais  $K^+$  e agmatina no TNF. O tratamento dos camundongos por via intracerebroventricular (i.c.v.) com doses subativas de tetraetilamônio (um inibidor não específico de canais de  $K^+$ , 25 pg/sítio), glibenclâmida (um inibidor de canais de  $K^+$  sensível ao ATP, 0,5 pg/sítio), caribdotoxina (inibidor de canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta e intermediária condutância, 25 pg/sítio) ou apamina (um inibidor de canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de baixa condutância, 10 pg/sítio), aumentou o efeito da agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) no TNF. Além disso, a administração da agmatina e inibidores de canais de  $K^+$ , sozinhos ou em combinação, não afetou a locomoção no campo aberto. Em adição, a redução no tempo de imobilidade produzida por uma dose ativa de agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF foi prevenida pelo pré-tratamento dos camundongos com os ativadores de canais de  $K^+$ , cromacalim (10  $\mu$ g/sítio, i.c.v.) e minoxidil (10  $\mu$ g/sítio, i.c.v.), sem que a atividade locomotora tenha sido afetada. Estes resultados sugerem que o efeito antidepressivo da agmatina no TNF esteja relacionado ao seu efeito modulatório na excitabilidade neuronal via inibição de canais de  $K^+$ . Adicionalmente, observou-se o efeito da agmatina na hiperatividade induzida por ouabaína em ratos, um modelo animal de mania. Neste estudo, o pré-tratamento dos animais com agmatina (0,1, 1 and 10 mg/kg, p.o., administrada duas vezes ao dia por 7 dias) atenuou mudanças comportamentais e bioquímicas elicitada pela administração de ouabaína, um inibidor da bomba Na, K-ATPase, por via i.c.v., em ratos Wistar. Ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.) aumentou significativamente a atividade locomotora no campo aberto. O pré-tratamento dos animais com cloreto de lítio (LiCl, 45 mg/kg, p.o.) preveniu completamente a hiperatividade, mas agmatina (0,1-10 mg/kg) preveniu parcialmente a hiperlocomoção induzida por ouabaína nos ratos. O tratamento com ouabaína causou peroxidação lipídica (aumento no nível de TBARS), no córtex e hipocampo, redução da atividade da glutathione peroxidase (GPx) no hipocampo e redução da atividade da glutathione redutase (GR) no córtex cerebral e hipocampo. Estes efeitos foram completamente prevenidos pelo pré-tratamento dos ratos com agmatina nas doses de 1 e 10 mg/kg (no aumento no nível de TBARS no córtex cerebral e somente na dose de 10 mg/kg no hipocampo), na dose de 0,1 mg/kg (na redução da atividade da GPx no hipocampo), e nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg (na redução na atividade da GR, nas duas estruturas cerebrais) e LiCl. Estes resultados mostram que a agmatina, de forma similar ao LiCl, foi capaz de prevenir as alterações neuroquímicas observados no modelo de mania induzido por ouabaína em ratos, mas reverteu parcialmente as alterações locomotoras. Juntos, estes resultados demonstram que a agmatina, além do efeito antidepressivo, via canais de  $K^+$ , parece ter propriedade antimaníaca.

## ABSTRACT

Mood disorders are chronic and severe mental disorders. Many compounds, as agmatine, have been investigated regarding their effects and underlying mechanisms in major depression and bipolar disorder. The administration of agmatine, an endogenous cationic amine, elicits an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test (FST) by a mechanism dependent on the inhibition of the NMDA receptors and the L-arginine-nitric oxide (NO) pathway. Since it has been reported that the NO can activate different types of potassium ( $K^+$ ) channels in several tissues, the present study investigated the possibility of synergistic interactions between different types of  $K^+$  channel inhibitors and agmatine in the FST. Treatment of mice by i.c.v. route with subeffective doses of tetraethylammonium (a non specific inhibitor of  $K^+$  channels, 25 pg/site), glibenclamide (an ATP-sensitive  $K^+$  channel inhibitor, 0.5 pg/site), charybdotoxin (a large- and intermediate-conductance calcium-activated  $K^+$  channel inhibitor, 25 pg/site) or apamin (a small-conductance calcium-activated  $K^+$  channel inhibitor, 10 pg/site), augmented the effect of agmatine (0.001 mg/kg, i.p.) in the FST. Furthermore, the administration of agmatine and the  $K^+$  channel inhibitors, alone or in combination, did not affect locomotion in the open-field test. Moreover, the reduction in the immobility time elicited by an active dose of agmatine (10 mg/kg, i.p.) in the FST was prevented by the pretreatment of mice with the  $K^+$  channel openers cromakalim (10  $\mu$ g/site, i.c.v.) and minoxidil (10  $\mu$ g/site, i.c.v.), without affecting locomotion. These results raise the possibility that the antidepressant-like effect of agmatine in the FST is related to its modulatory effects on neuronal excitability, via inhibition of  $K^+$  channels. Furthermore, we investigated the effect of agmatine in the ouabain-induced hyperactivity in rats, an animal model of mania. In this study, the pretreatment of the animals with agmatine (0.1, 1 and 10 mg/kg, p.o. administered twice a day for 7 days) was able to attenuate the behavioral and neurochemical changes elicited by acute administration of ouabain, a Na,K-ATPase-inhibiting compound, given by i.c.v. route, in Wistar rats. Ouabain (10  $\mu$ M/site) significantly increased motor activity in the open-field test. The pretreatment with lithium chloride (LiCl, 45 mg/kg, p.o.) for seven days completely prevented the hyperactivity, but agmatine (0.1-10 mg/kg) partially prevented the ouabain-induced hyperlocomotion. Ouabain treatment elicited lipid peroxidation (increased TBARS levels) and reduced the glutathione peroxidase (GPx) activity in the hippocampus and glutathione reductase (GR) activity in the cerebral cortex and hippocampus, effects that were completely prevented in rats pretreated with agmatine and LiCl. These results show that agmatine, in a way similar to LiCl, is able to prevent the neurochemical alterations observed in the ouabain-induced model of mania in rats, but was able to reverse only partially the ouabain-induced hyperlocomotion. Together, these results suggest that agmatine has not only antidepressant-like effects through an interaction with  $K^+$  channels, but also antimanic properties.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Transtornos de humor**

Os transtornos de humor são doenças comuns, severas, crônicas e muitas vezes, ameaçadoras de vida (American Psychiatric Association, 1994) e se constituem em mudanças patológicas episódicas no estado emocional, as quais estão associadas com anormalidades na cognição e comportamento. Estes transtornos estão associados com uma significativa disfunção psicossocial e encontram-se entre as 30 principais causas de doenças no mundo (Frangou, 2006). De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais, IV edição da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV), os transtornos de humor são classificados como transtorno depressivo maior (depressão unipolar ou maior) caracterizado por episódios depressivos recorrentes e transtorno afetivo bipolar (transtorno bipolar), que apresenta episódios de depressão alternados com episódios de mania ou hipomania (American Psychiatric Association, 1994; Frangou, 2006).

Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que os transtornos mentais, incluindo os transtornos de humor, são altamente prevalentes, perfazendo em torno de 28 %, ou seja, contribuindo com um quarto para todas as doenças que mais provocam prejuízos funcionais em um indivíduo (Prince et al., 2007), ou seja, estão entre os maiores problemas de saúde pública do mundo (Nestler e Carlezon, 2006). As doenças que mais contribuem para este prejuízo funcional são: depressão maior (11,8 %), transtornos relacionados ao uso do álcool (3,3 %), esquizofrenia (2,8 %), transtorno bipolar (2,4 %) e demência (1,6 %) (Prince et al., 2007). Estes transtornos estão associados com alto índice de morbidade e mortalidade. Pacientes acometidos por depressão maior ou transtorno bipolar apresentam uma taxa de suicídio em torno de 15%. Desta forma, estes transtornos promovem sofrimento incalculável,

prejuízos funcionais que limitam a vida social do paciente e alto custo financeiro (Picchini et al., 2004; McIntyre et al., 2006; Prince et al., 2007).

Várias regiões do cérebro estão envolvidas no processamento da emoção e na integração da emoção com cognição e funções viscerais, incluindo o córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior, amígdala, giro parahipocampal e hipocampo. Estas regiões estão interconectadas e também conectadas com outras estruturas cerebrais como o tálamo, hipotálamo e estriato (Frangou, 2006). Os transtornos de humor estão associados a mudanças patofisiológicas envolvendo alterações morfológicas destas regiões específicas, como redução de tamanho destas regiões, vulnerabilidade seletiva à morte celular de subpopulações de neurônios, alterações neuroquímicas a nível de receptor, na sinalização intracelular e na regulação da expressão gênica (Tsankova et al., 2007).

A origem dos transtornos de humor, de uma forma geral, pode estar associada a fatores ambientais e principalmente a fatores genéticos e outros fatores biológicos, ou seja, apresentam etiologia multifatorial e são altamente heterogêneos (Picchini et al., 2004; Prince et al., 2007; Tsankova et al., 2007). Desta forma, a etiologia e a neurobiologia destes transtornos ainda não se encontram totalmente elucidadas (Shaltiel et al., 2007). Porém, sabe-se que estas condições neuropsiquiátricas são anormalidades comportamentais longas e duradouras. Em muitos indivíduos, estas doenças desenvolvem-se gradualmente e mostram um curso crônico e remitante, ao longo da vida. A reversão dos sintomas em resposta ao tratamento farmacológico disponível no mercado farmacêutico ocorre dentro de semanas ou meses (Picchini et al., 2004; Frangou, 2006; Tsankova et al., 2007).



### 1.1.1. Depressão maior

Depressão é uma das condições neuropsiquiátricas mais comuns e altamente incapacitante com uma prevalência de 10-30 % em mulheres e 7-15 % em homens (Nair e Vaidya, 2006; Tierney, 2007). Estima-se que na população geral, a prevalência da depressão na vida de um indivíduo se situa em torno de 15-17 % (Holtzheimer e Nemeroff, 2006) e pacientes que sofrem de depressão severa apresentam altas taxas de comorbidades e mortalidade, com conseqüências econômicas e sociais profundas (Nemeroff e Owens, 2002; Nemeroff, 2006). A depressão é a segunda causa de incapacitação no mundo, sendo a primeira a doença cardíaca (Holtzheimer e Nemeroff, 2006).

A depressão resulta, pelo menos em parte, de uma deficiência na atividade monoaminérgica na fenda sináptica (Elhwuegi, 2004). Além desses, vários outros sistemas de neurotransmissores e mecanismos de transdução de sinal estão envolvidos, como os receptores glutamatérgicos do sub-tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) e a via da L-arginina-óxido nítrico (NO) (Skolnick et al., 1999; Petrie et al., 2000; Holscher, 1997; Harkin et al., 1999), o sistema opióide (Gabilondo et al., 1999), o sistema GABAérgico (Nakagawa et al., 1996), os canais de potássio ( $K^+$ ) (Tygat et al., 1997; Guo et al., 1996; Galeotti et al., 1999) e os canais de cálcio (Galeotti et al., 2006).

Além disso, a depressão pode ser desencadeada por alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (cálcio calmodulina cinase II (CaMKII), proteína cinase C (PKC), proteína cinase A (PKA), proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK)/cinase regulada por sinal extracelular (ERK), proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), caspase 3 e 6, proteína antiapoptótica Bcl2, glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3) e proteína cinase B (PKB ou Akt)) (Skolnick, 1999; Dwivedi et al., 2001; Manji et al., 2001; Gould et

al., 2004; Picchini et al., 2004; Perera et al., 2007; Pittenger e Duman, 2008), aumento no estresse oxidativo (Bilici et al., 2001), liberação de citocinas pró-inflamatórias associadas com a ativação do sistema imune (Dunn et al., 2005), aumento dos níveis plasmáticos de glicocorticóides e desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Perera et al., 2007; Pittenger e Duman, 2008).

A terapia não farmacológica para a depressão inclui a psicoterapia (principalmente a terapia cognitiva comportamental) e terapia eletroconvulsiva que mostram eficácia antidepressiva e podem propiciar melhor qualidade de vida aos pacientes. Apesar destes tratamentos mostrarem claros benefícios, ainda apresentam muitos problemas e muitas questões acerca de seus mecanismos permanecem obscuras (Holtzheimer e Nemeroff, 2006).

Alguns fármacos disponíveis para o tratamento da depressão foram descobertos ao acaso há mais de 50 anos atrás, como os antidepressivos tricíclicos e inibidores da enzima monoamina oxidase. Estes fármacos ainda encontram-se no mercado farmacêutico, apesar de apresentarem muitos efeitos colaterais que limitam o seu uso. Além desses, outros medicamentos foram desenvolvidos e estão disponíveis no mercado para a utilização no tratamento da depressão, como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) e/ou noradrenalina e dopamina, que são tão efetivos quanto os tricíclicos, mas são mais seletivos e produzem menos efeitos colaterais. Além disso, recentemente sugeriram os inibidores triplos da recaptação de monoaminas e, segundo estudos clínicos e pré-clínicos, apresentam um início de ação terapêutica mais rápida e maior eficácia do que os antidepressivos tradicionais (Frazer, 1997; Anderson et al., 2000; Nestler et al., 2002b; Elhwuegi, 2004; Berton e Nestler, 2006; Holtzheimer e Nemeroff, 2006; Nemeroff, 2006; Chen e Skolnick, 2007).

O tratamento da depressão é geralmente seguro e efetivo, porém está longe do ideal, pois o tempo de latência para obter benefícios clínicos é relativamente longo, este

período de resposta terapêutica dura entre 3-5 semanas, e conforme mencionado anteriormente há grandes problemas ainda quanto aos efeitos colaterais como perda da libido e ganho de peso, entre outros. Embora a terapia para a depressão com fármacos, psicoterapia e terapia eletroconvulsiva seja efetiva, um número significativo de pacientes não respondem bem a estes tratamentos (Anderson et al., 2000; Berton e Nestler, 2006; Holtzheimer e Nemeroff, 2006). Por exemplo, menos de 50 % dos pacientes mostram remissão completa dos sintomas com a terapia com antidepressivos com ou sem a associação da psicoterapia. Por isso, há uma grande necessidade por fármacos com ação rápida, seguros e efetivos para a depressão (Berton e Nestler, 2006).

A fim de estudar alguns aspectos da depressão, muitos modelos animais de depressão são utilizados, uma vez que são ferramentas indispensáveis para o estudo de novos fármacos antidepressivos e o conhecimento acerca dos mecanismos responsáveis pela patofisiologia desta doença (Cryan et al., 2002; Nestler et al., 2002a/b; Cryan e Slattery, 2007). Entre eles encontram-se, o teste do nado forçado (TNF), descrito primeiramente por Porsolt et al. (1977) utilizado em ratos e posteriormente em camundongos e o teste de suspensão da cauda (TSC), descrito primeiramente por Steru et al. (1985) utilizado em camundongos. Eles são modelos animais preditivos de atividade antidepressiva e são baseados na observação do animal em estado de desespero comportamental, que se movimenta para fugir de uma situação inescapável, desenvolvendo após os primeiros minutos uma postura imóvel que pode ser revertida pela administração de antidepressivos. Estes testes estão entre os mais utilizados para seleção de novos fármacos antidepressivos, são de fácil uso e de boa reprodutibilidade (Cryan et al., 2002; Nestler et al., 2002a/b; Cryan e Slattery, 2007).

Além desses, são utilizados outros modelos animais para depressão, que além da validade preditiva, tem validade fenomenológica e/ou de constructo, como o desamparo

aprendido, modelos baseado na indução de estresse, modelos farmacológicos, entre outros (Nestler et al., 2002b; McArthur e Borsini, 2006; Cryan e Slattery, 2007).

### **Envolvimento dos canais de $K^+$ na fisiopatologia da depressão maior**

Os canais de potássio são proteínas transmembranas que formam poros iônicos seletivos ao potássio ( $K^+$ ) que são constitutivamente abertos no repouso e são centrais para a função neural (Choe, 2002; Honoré, 2007). Um neurônio freqüentemente expressa múltiplos tipos de canais de  $K^+$  que desempenham várias funções na sinalização celular (Yuan e Chen, 2006). Entre as várias funções desempenhadas pelos canais de  $K^+$ , encontra-se principalmente a promoção do restabelecimento do potencial de membrana, através da hiperpolarização e, portanto, tendência em reduzir a excitabilidade das células (Honoré, 2007).

As subunidades que compõem os canais de  $K^+$ , nos mamíferos, são codificadas por vários genes, em torno de 80, e podem ser divididas em três principais classes estruturais compreendendo dois, quatro ou seis segmentos transmembrana. A característica comum entre os canais de  $K^+$  é a presença de um domínio denominado P, formador do poro, por onde ocorre a condução do  $K^+$ . Os canais que apresentam dois segmentos transmembrana são constituídos por um domínio P simples, ou seja, um simples poro e codificam para os canais retificadores internos. Entre os representantes desta família encontram-se GIRK (canais de  $K^+$  retificadores interno acoplados a proteína G). Estes canais, operam em potenciais de membrana negativo, contribuindo para o restabelecimento do potencial de repouso da membrana. Os canais de  $K^+$  com seis domínios transmembrana, também apresentam um único poro e compreendem os canais de  $K^+$  ativados por voltagem e os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$ . Um dos representantes desta família são os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  de alta condutância (canais BK). Estes canais são geralmente ativados em membranas despolarizadas

e contribuem para a repolarização da membrana. Uma terceira classe, mais recentemente descoberta, é representada pelos canais de  $K^+$  que apresentam quatro domínios transmembrana e apresentam dois domínios P, ou seja, dois poros. Estes canais influenciam tanto o potencial de repouso da membrana quanto a duração do potencial de ação. A família dos canais  $K^+$  de dois poros apresenta em torno de 15 membros, entre eles os canais de  $K^+$  relacionados aos canais de  $K^+$  de retificação interna fraca com domínios P sequenciais – TWIK- (TREK) e canais de  $K^+$  relacionados ao TWIK ativados por ácido araquidônico (TRAAK) (Patel e Honoré, 2001; Choe, 2002; Yuan e Chen, 2006; Honoré, 2007).

Portanto, a atividade de canais de  $K^+$  está envolvida em vários processos fisiológicos incluindo a regulação de atividade neuronal e a propagação de sinal (Shieh et al., 2000; Mackinnon, 2003).

A atividade dos canais de  $K^+$  pode ser regulada por NO. Alguns estudos indicam que o NO pode ativar diferentes tipos de canais de  $K^+$  em tecidos como músculo liso e cérebro (Bolotina et al., 1994; Armstead, 1996; Shin et al., 1997; Jeong et al., 2001). Em adição, outros estudos sugerem que doadores de óxido nítrico são também capazes de ativar estes canais (Willians et al., 1988; Fujino et al., 1991). No cérebro, NO é produzido principalmente em estruturas pós-sinápticas como uma resposta a ativação de receptores NMDA acompanhado pelo influxo de cálcio, o qual se liga a calmodulina que ativa a enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Denninger e Marletta, 1999). Então, a inibição de receptores NMDA e a redução do nível de NO previne a ativação de canais de  $K^+$ . Isso foi reforçado por um trabalho do nosso grupo, demonstrando que o efeito antidepressivo de inibidores de canais de  $K^+$  no TNF foi prevenido pelo pré-tratamento dos camundongos com L-arginina, uma precursora de NO (Kaster et al., 2005).

Vários estudos pré-clínicos sugerem o envolvimento de canais de  $K^+$  na modulação da depressão. Diferentes tipos de inibidores de canais de  $K^+$  como tetraetilamônio

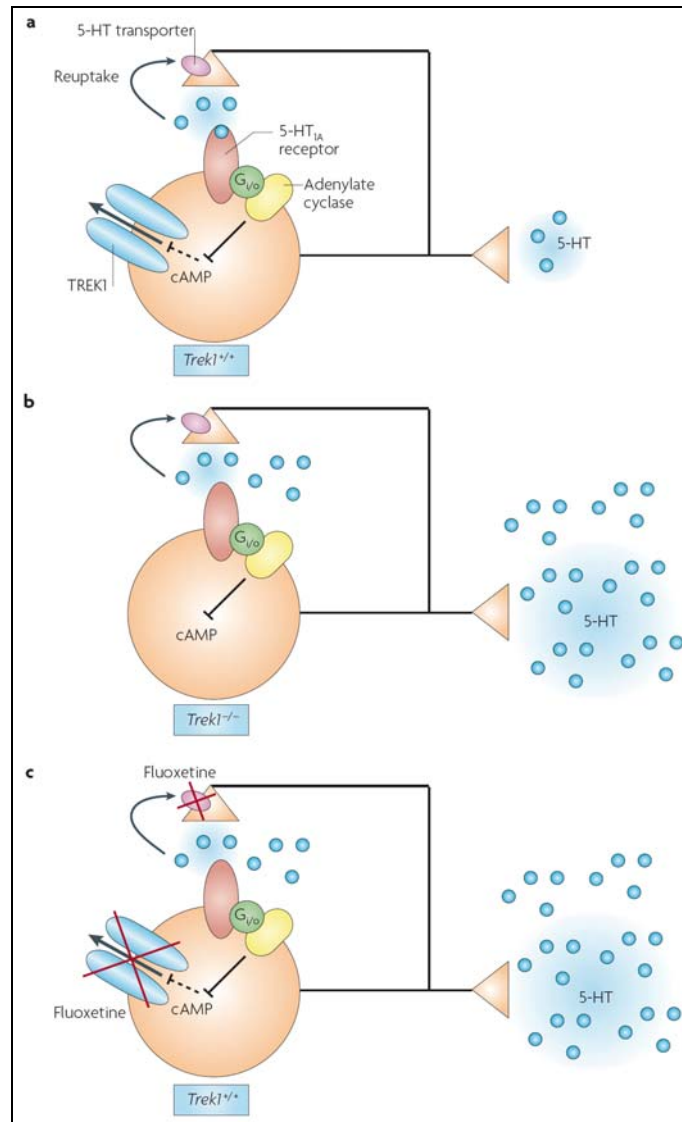
(TEA), apamina, caribdotoxina, gliquidona ou glibenclamida produzem um efeito antidepressivo no TNF em camundongos (Galleoti et al., 1999; Inan et al., 2004; Kaster et al., 2005; Kaster et al., 2007), enquanto que a administração de minoxidil ou cromakalim (drogas que abrem canais de  $K^+$ ) em camundongos, provocam um aumento do tempo de imobilidade, evidenciando assim, um efeito tipo depressivo no TNF. Além disso, Kaster et al. (2007) demonstraram que o efeito antidepressivo da adenosina, um nucleosídeo endógeno com propriedade antidepressiva, pode ser mediado por inibição de canais de  $K^+$ .

Adicionalmente, estudos indicam que a fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina (5-HT) geralmente usado para tratar depressão, age como um potente inibidor de vários canais iônicos, incluindo canais de  $K^+$  (Choi et al., 2004) modulando a excitabilidade neuronal (Tytgat et al., 1997; Yeung et al., 1999; Choi et al., 2004). Outras classes de fármacos antidepressivos como imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina, clomipramina, maprotilina, citalopram e paroxetina também produzem uma inibição da corrente de  $K^+$ , o que poderia justificar seu efeito terapêutico (Nicholson et al., 2002; Kobayashi et al., 2004, 2006). Por outro lado, evidências na literatura mostram que a administração de gliburida, um inibidor de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP, foi capaz de potencializar a ação de inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina no TNF (Guo et al., 1995, 1996).

Estudos indicam que uma classe especial de canais de  $K^+$  de dois poros parece estar envolvida na regulação do humor. Através da inativação genética de canais de potássio TREK-1, foi mostrado o envolvimento deste tipo de canal de  $K^+$  na depressão (Heurteaux et al., 2006; Gordon e Hen, 2006; Honoré, 2007; Mathie e Veale, 2007). Em humanos os canais TREK-1 são altamente expressos no cérebro, particularmente abundante em interneurônios GABAérgicos do núcleo caudato e putâmem e também no córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo, neurônios serotoninérgicos do núcleo dorsal da rafe no mesencéfalo e neurônios

sensoriais do gânglio da raiz dorsal. Ainda, estes canais encontram-se em tecidos periféricos como o trato gastrointestinal. Portanto, esse subtipo de canal de  $K^+$  é expresso em regiões do encéfalo que estão relacionadas com a patofisiologia da depressão (Honoré, 2007). Além disso, fortes evidências indicam que o efeito terapêutico da fluoxetina é dependente da inibição de canais TREK-1 (Kennard et al., 2005).

Parece que a fluoxetina age principalmente por inibir canais de  $K^+$  de dois poros como TREK-1. A atividade de neurônios serotoninérgicos apresentou-se aumentada em camundongos knockout para TREK-1, assim como em camundongos selvagens sem a deleção do gene que codifica para TREK-1, com o tratamento com ISRS, como a fluoxetina. Os canais TREK-1, como mencionado anteriormente, encontram-se em neurônios serotoninérgicos que estão presentes em grande quantidade no núcleo dorsal da rafe no mesencéfalo. Em camundongos knockouts, estes neurônios serotoninérgicos apresentam um aumento na taxa de disparo de potenciais de ação, e em função disso, provavelmente aumenta a liberação de serotonina em estruturas alvos como o hipocampo. Em neurônios da rafe, a estimulação de autoreceptores  $5-HT_{1A}$  reduz o disparo neuronal e conseqüentemente a liberação de serotonina. Esta estimulação ativa a proteína inibitória ( $G_i$ ), que inibe a adenilato ciclase e ativa canais de  $K^+$  de retificação interna acoplados a proteína G (GIRK), promovendo assim este *feedback* negativo. A redução na concentração de AMPc, em conseqüência da inibição da adenilato ciclase, em neurônios serotoninérgicos pode induzir a abertura de canais TREK-1, em função da fosforilação diminuída por proteína cinase A (PKA). Portanto, de acordo com este modelo, camundongos knockout para TREK-1 podem reduzir o *feedback* negativo para a liberação de serotonina em neurônios pré-sinápticos, resultando no aumento da neurotransmissão serotoninérgica. Este pode ser um possível mecanismo pelo qual os antidepressivos desempenham seu papel terapêutico na depressão (Figura 1) (Heurteaux et al., 2006; Gordon e Hen, 2006; Honoré, 2007; Mathie e Veale, 2007).



**Figura 1.** (a) A estimulação de receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1A</sub> inibe a adenilato ciclase via proteína Gi/o. Em consequência disso há uma redução do nível de AMP cíclico intracelular (AMPc) que contribuirá para o aumento da atividade de canais TREK-1, devido a diminuição da fosforilação mediada pela proteína cinase A (PKA). A abertura de canais TREK-1 induz a hiperpolarização celular, reduzindo a taxa de disparo do neurônio e então reduzindo a liberação de serotonina apartir de neurônios no núcleo dorsal da rafe. A serotonina é removida da fenda sináptica por transportadores expressos nos neurônios da rafe. A serotonina está envolvida na regulação de várias funções no cérebro, incluindo depressão, humor, emoção, agressão, sono, apetite, memória e percepção. (b) Em camundongos knockouts para TREK, o feedback de hiperpolarização é reduzido, aumentado a liberação de serotonina. (c) A serotonina nestas vias é alvo terapêutico de muitos antidepressivos como os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), como a fluoxetina, que reduz a recaptação de serotonina. Portanto, a inibição direta de canais TREK-1 por ISRS poderão também contribuir para aumentar a excitabilidade de neurônios do núcleo dorsal da rafe e liberar serotonina (Retirado de Honoré, 2007).

Também há fortes evidências de que os canais de K<sup>+</sup> da família GIRK, que estão amplamente distribuídos pelo cérebro e apresentam um único poro, podem participar do



mecanismo de ação de antidepressivos como fluoxetina e paroxetina (Kobayashi et al., 2003, 2004, 2006; Takahashi et al., 2006).

Estes dados sugerem que o efeito modulatório de fármacos antidepressivos e de compostos dotados de potencial antidepressivo sobre a excitabilidade neuronal, via inibição de canais de  $K^+$ , pode representar uma via final comum de sua ação farmacológica (Guo et al., 1995, 1996).

### **1.1.2. Transtorno bipolar**

O transtorno bipolar é um transtorno de humor crônico e severo. A prevalência desta doença na vida de um indivíduo encontra-se na faixa de 1,3-1,6 %. Este transtorno está associado com alto nível de prejuízo funcional, morbidade, mortalidade e um risco aumentado de suicídio e é caracterizado pelo aparecimento de episódios de mania ou hipomania alternados com episódios depressivos (Müller-Oerlinghausen et al, 2002). Durante os episódios maníacos, pacientes exibem comportamento compulsivo, hipersexualidade, discurso eloqüente, fuga de idéias e hiperatividade que profundamente prejudicam e destroem a vida social, ocupacional e familiar destes indivíduos (Young et al., 2007).

A etiologia e a patofisiologia do transtorno bipolar ainda não estão bem entendidas. Contudo, vários estudos sugerem que neste transtorno há uma mudança na atividade dopaminérgica, serotoninérgica, noradrenérgica (Vawter et al., 2000; Müller-Oerlinghausen et al, 2002; Brugue e Vieta, 2007), uma desregulação do eixo HPA (Vawter et al., 2000; Müller-Oerlinghausen et al, 2002; Watson et al., 2004), atividade diminuída da bomba sódio-potássio ATPase ( $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase) (El-Mallakh e Wyatt, 1995; Müller-Oerlinghausen et al, 2002; Herman et al., 2007), alterações nas vias de sinalização que regulam a neuroplasticidade e a sobrevivência celular (CaMKII, PKC, PKA, MAPK/ERK,

CREB, BDNF, caspase3 e 6, Bcl2, GSK-3 e Akt) (Lachman e Papolos, 1995; Manji e Lenox, 2000; Einat et al., 2003; Manji et al., 2003; Gould et al., 2004; Picchini et al., 2004; Shaltiel et al., 2007) e estresse oxidativo (Kuloglu et al., 2002; Ranjekar et al., 2003; Frey et al., 2007).

A terapia para o transtorno bipolar baseia-se atualmente nos agentes estabilizadores de humor como lítio, valproato, carbamazepina e mais recentemente em agentes anticonvulsivantes como a lamotrigina (Bourin e Prica, 2007). O lítio foi descoberto como um agente com propriedades anti-maníacas há mais de 50 anos atrás e ainda é considerado o medicamento de primeira escolha para o tratamento do transtorno bipolar. Porém, em 40% dos pacientes a terapia com lítio é insatisfatória devido a pobre resposta, contra indicação médica ou efeitos colaterais como prejuízo cognitivo e emocional ou ganho de peso (Okuma, 1993; Price e Henninger, 1994). Embora os estudos sobre agentes com estabelecida eficácia anti-maníaca estejam aumentando e muitos agentes com propriedades anti-maníaca estejam sendo identificados, alguns pacientes ainda apresentam resposta pobre com os fármacos disponíveis no mercado farmacêutico.

Novas opções de tratamento estão surgindo, como a utilização da lamotrigina para o tratamento do transtorno bipolar, como mencionado anteriormente. Este fármaco age na atenuação dos sintomas, tanto na fase da depressão quanto na fase da mania. Porém, ainda há necessidade de estudos para novos agentes antimaníacos, bem como, agentes que possam agir tanto na fase da mania como na fase da depressão, como a lamotrigina (Brugue e Vieta, 2007; Bourin e Prica, 2007).

Em função da patofisiologia da doença ainda não estar bem conhecida e ter um padrão oscilatório, existe uma particular dificuldade para desenvolver um modelo animal que reproduza todos os sintomas do transtorno bipolar (Gould e Einat, 2007), pois os modelos existentes reproduzem somente a fase da depressão ou a fase da mania, mas não as duas fases (Nestler et al., 2002b). Com a descoberta de que a redução da atividade da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -

ATPase pode estar envolvida na patofisiologia do transtorno bipolar, ocorreu a proposta de um modelo animal de mania, baseado na inibição da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, com a administração de ouabaína, um potente e específico inibidor da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (Ruktanonchai et al., 1998). A administração intracerebroventricular (i.c.v.) da ouabaína pode induzir hiperlocomoção em ratos, o que se assemelha à agitação psicomotora observada em pacientes com transtorno bipolar (El-Mallakh et al., 1995; Li et al., 1997; Decker et al., 2000; Machado-Vieira et al., 2004; El-Mallakh et al., 2006). Estabilizadores de humor, como lítio (Li et al 1997; El-Mallakh et al., 2003) e agentes antipsicóticos, como o haloperidol (El-Mallakh et al., 2006) previnem mudanças comportamentais induzidas por ouabaína em ratos.

Além do modelo animal de mania induzido por ouabaína, existem outros modelos como o de mania induzido por anfetamina em roedores (Frey et al., 2006a; Arban et al., 2005).

### **Transtorno bipolar e bomba de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase**

No transtorno bipolar, tanto a fase da mania quanto a fase da depressão estão associadas com atividade diminuída da bomba de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, que é necessária para o funcionamento de todos os tecidos excitáveis por manter e restabelecer, depois de cada potencial de ação, o gradiente eletroquímico (El-Mallakh e Wyatt, 1995). No transtorno bipolar, a atividade diminuída da bomba de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase pode ser secundária ao aumento excessivo de um composto endógeno tipo-ouabaína (Christo e El-Mallakh, 1993). Este distúrbio pode ser central para a patogênese do transtorno bipolar por aumentar a excitabilidade da membrana e diminuir a liberação de neurotransmissores em humanos (El-Mallakh e Wyatt, 1995; Herman et al., 2007). A atividade diminuída da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase pode acarretar várias mudanças nas células como: a) a taxa diminuída de efluxo de

$\text{Na}^+$  pode aumentar as concentrações de  $\text{Na}^+$  intracelular. O efluxo compensatório de  $\text{K}^+$  procura restabelecer as concentrações relativas de íon, o aumento absoluto de  $\text{Na}^+$  intracelular resultará em um maior (menos negativo) potencial de repouso; b) o aumento na concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular pode alterar a magnitude do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  nos terminais pré-sinápticos; c) o aumento intracelular das concentrações de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  pode aumentar a hidrólise do fosfatidilinositol, gerando um sinal de segundo mensageiro na ausência de primeiro mensageiro; d) A atividade da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase determina a duração do período refratário do neurônio, após cada despolarização, portanto, a atividade reduzida desta bomba pode provocar alterações no período refratário de um neurônio (El-Mallakh e Wyatt, 1995; Hermam et al., 2007).

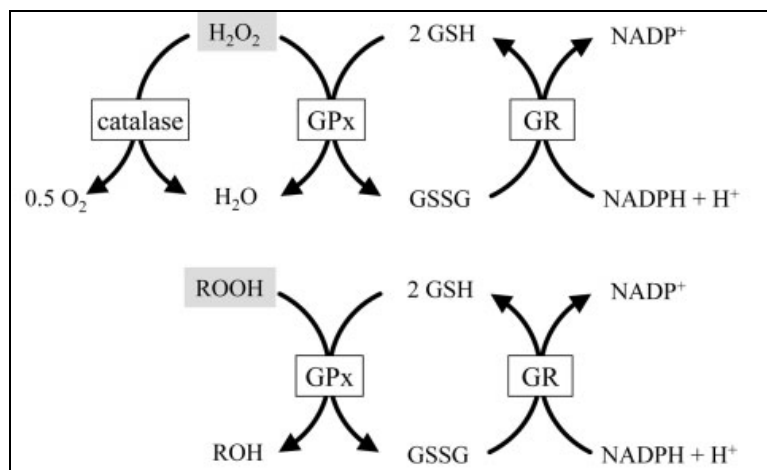
Estas alterações podem ocasionar muitas conseqüências danosas ao sistema nervoso central (SNC), como aumento da excitabilidade neuronal e aumento da duração da liberação de neurotransmissores por diminuir a taxa de *clearance* de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por outro lado, enquanto a redução da atividade da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase pode ocasionar um potencial de repouso com limiar menor, pode também diminuir a amplitude do potencial de ação e reduzir a liberação de neurotransmissores. O restabelecimento neuronal depois do disparo do potencial de ação torna-se prejudicado. Conseqüentemente, uma modesta diminuição da atividade da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase produz um aumento global na excitabilidade (ou irritabilidade) dos neurônios, que é proposto representar a fase da mania. Uma redução mais significativa da atividade da bomba pode acentuar a irritabilidade neuronal, mas reduzir a eficácia sináptica e a velocidade de recuperação do potencial de repouso pelos neurônios. Estas alterações podem produzir déficits cognitivo e motor acompanhado por irritabilidade, geralmente encontrados no transtorno bipolar (El-Mallakh e Wyatt, 1995; Hermam et al., 2007).

## **Transtorno bipolar e estresse oxidativo**

O estresse oxidativo é um desequilíbrio na geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), o qual induz um aumento da concentração intracelular de ROS e RNS e conseqüentemente induz a destruição oxidativa da célula por promover peroxidação lipídica, protéica e quebra do DNA (Sies, 1986; Dringer et al., 2005).

Existem muitos antioxidantes de baixo peso molecular, bem como várias proteínas com função antioxidante que podem contribuir para a remoção das ROS e conseqüente proteção contra o estresse oxidativo (Dringer et al., 2005). A glutathiona (GSH) representa um importante agente endógeno com grande potencial antioxidante nas células. A glutathiona é um tripeptídeo (L- $\gamma$ -glutamil-L-cistienilglicina), tiol não protéico que contém cisteína, muito abundante nas células dos mamíferos (Dirnagl et al, 2003; Dringer et al., 2005) que participa de diversos processos celulares, tais como a síntese de DNA, proteínas, leucotrienos e a modulação da função protéica (Sims et al, 2004; Njalsson, 2005).

A GSH pode reagir não enzimaticamente com diversos compostos oxidantes ou servir de substrato para a ação da enzima glutathiona peroxidase (GPx) na detoxificação de peróxidos orgânicos e de hidrogênio (Figura 2). A GSH também pode participar de outras reações antioxidantes, tais como na detoxificação de compostos eletrofílicos, como o 4-hidroxinonenal, pela ação da glutathiona S-transferase (Maher, 2005). A eliminação de peróxidos mediada pela GPx conduz à formação da glutathiona dissulfeto (GSSG, glutathiona oxidada), a qual pode ser reduzida novamente à GSH por meio da enzima glutathiona redutase (GR), em uma reação dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida (NADPH) (Figura 2) (Wang e Balltor, 1998).



**Figura 2.** Vias envolvidas na metabolização de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroperóxidos orgânicos ( $ROOH$ ).  $H_2O_2$  é convertida por catalase em oxigênio e água, enquanto a glutatona peroxidase (GPx) reduz tanto  $H_2O_2$  quanto  $ROOH$  a água e ao álcool correspondente, respectivamente. A glutatona (GSH), que é oxidada a dissulfeto de glutatona (GSSG) durante a reação da GPx, é regenerada pela glutatona redutase (GR). NADPH que é consumido como co-substrato nas reações catalizadas por GR é fornecido pela glicose-6-fosfato desidrogenase (retirado de Dringen et al., 2005).

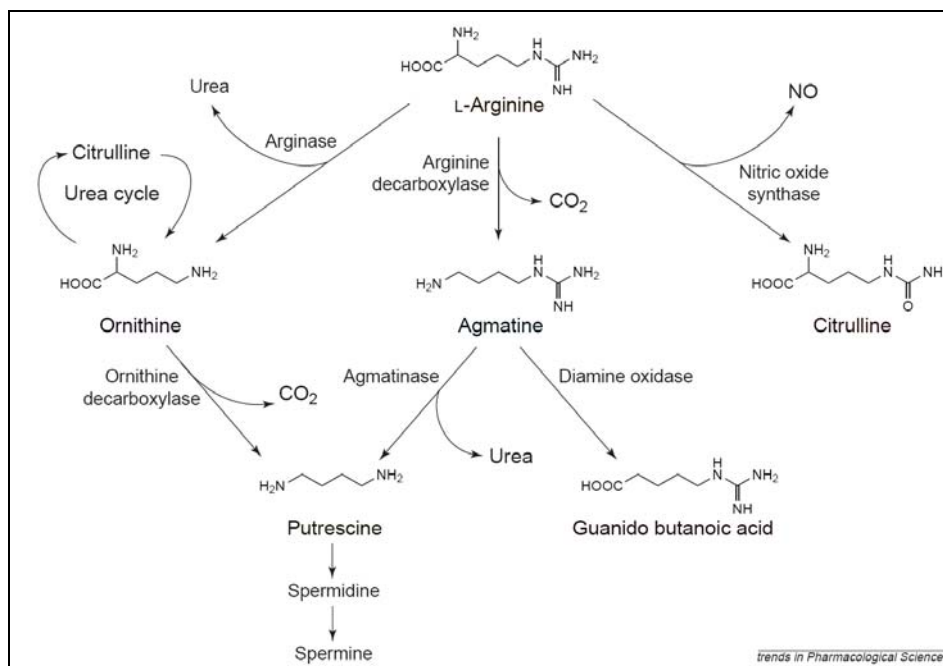
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como malonildialdeído são biomarcadores para a mensuração de peroxidação lipídica em vários tecidos, incluindo o cérebro. Em consequência do estresse oxidativo, poderá haver um aumento de lipoperoxidação de membrana nas células (Cherubini et al., 2005).

Muitos estudos sugerem que o estresse oxidativo está associado com a patofisiologia do transtorno bipolar (Frey et al., 2007; Kuloglu et al., 2002; Machado-Vieira et al., 2007; Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003). Evidências indicam que há aumento da peroxidação lipídica, indicado pelo nível aumentado de TBARS no soro de pacientes com transtorno bipolar (Kuloglu et al., 2002; Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003; Andreazza et al., 2007a; Machado-Vieira et al., 2007). Outras evidências indicam que há uma diminuição da atividade da catalase e glutatona peroxidase e um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (Ozcan et al., 2004; Kuloglu et al., 2002), bem como dano ao DNA em pacientes com este transtorno (Buttner et al., 2007; Frey et al., 2007; Andreazza et al., 2007b). Um estudo de Andreazza et al. (2007a) indica que o estresse oxidativo é particularmente mais

acentuado durante a fase maníaca. Além disso, algumas evidências sugerem que agentes estabilizadores de humor como lítio e valproato exercem efeito antioxidante em culturas de células neuronal em condições excitotóxicas (Shao et al., 2006, 2008) e a glutatona pode ser um alvo comum para o efeito destes estabilizadores de humor (Cui et al., 2007). Em adição, lítio e valproato exercem um efeito protetor contra o estresse oxidativo em um modelo animal de mania induzido por anfetamina (Frey et al., 2006b) e o tratamento com lítio diminui o nível de TBARS no plasma de pacientes com transtorno bipolar (Aliyazicioglu et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2007) .

## **1.2. Agmatina**

A agmatina é uma amina catiônica, conhecida como um produto intermediário no metabolismo de monoaminas, encontrada em plantas, bactérias e invertebrados. Ela foi descoberta em 1994 em mamíferos e é sintetizada pela descarboxilação da L-arginina em uma reação catalisada pela enzima arginina descarboxilase. A agmatina pode ser metabolizada a produtos como espermina durante a biossíntese de poliaminas, por ação da enzima agmatinase ou metabolizada a ácido guanido butanóico, por ação da enzima diamina oxidase (Figura 3) (Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001; Moinard et al., 2005).



**Figura 3.** Vias metabólicas da agmatina e os compostos relacionados. A agmatina é sintetizada a partir da L-arginina pela ação da arginina descarboxilase. A agmatina pode ser metabolizada a produtos como espermina durante a biossíntese de poliaminas, por ação da agmatinase ou ácido guanido butanóico, por ação da diamina oxidase (retirado de Reis e Regunathan, 2000).

A concentração da agmatina em mamíferos varia regionalmente. No encéfalo representa aproximadamente 10% da concentração presente no estômago, órgão que apresenta altas concentrações desta amina. Ela está presente no córtex cerebral (principalmente lâmina VI e V), hipocampo, complexo amigdalóide, hipotálamo, tronco cerebral. A nível subcelular, a agmatina está presente no corpo celular, dendritos, axônios e terminais axônicos do neurônio. Então, a distribuição da agmatina está concentrada em regiões do encéfalo responsáveis pelo controle endócrino e visceral, processamento das emoções, dor, percepção e cognição (Reis e Regunathan, 2000).

A agmatina foi proposta como sendo um neurotransmissor no SNC (Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001), uma vez que é sintetizada no encéfalo, estocada em vesículas sinápticas, acumulada por captação, liberada de maneira dependente de cálcio por despolarização, metabolizada e degradada a putrescina por agmatinase e captada por



sinaptossomos (Reis e Regunathan, 2000). Foi demonstrado também que a agmatina atravessa a barreira hemato-encefálica, através de um estudo com injeção periférica de agmatina (Piletz et al., 2003).

A agmatina liga-se com moderada afinidade a receptores nicotínicos de acetilcolina,  $\alpha_2$ -adrenérgicos e receptores imidazólicos. Liga-se a receptores imidazólicos do tipo 1 ( $I_1$ ) como consequência promove redução da pressão sanguínea central, natriurese, fluxo urinário, analgesia e está relacionada com a depressão. Liga-se também a receptores imidazólicos do tipo 2 ( $I_2$ ) e promove redução da atividade da monoamina oxidase, crescimento celular, analgesia e está relacionada com a depressão. A agmatina também inibe os receptores NMDA e todas as isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) no encéfalo (Reis e Regunathan, 2000; Raasch et al., 2001; Moinard et al., 2005). Esta amina liga-se com baixa afinidade em receptores  $\alpha_1$ - e  $\beta$ -adrenérgicos, 5-HT<sub>3</sub>-serotoninérgicos e D<sub>2</sub>-dopaminérgicos,  $\kappa$ -opiíóides e receptores A<sub>1</sub>-adenosinérgicos (Figura 3) (Raasch et al., 2001).

A função biológica da agmatina já está bem descrita. Apresenta propriedade neuroprotetora, uma vez que algumas evidências indicam que ela protege culturas de células de hipocampo contra a excitotoxicidade por glutamato (Olmos et al., 1999; Wang et al., 2006) e contra a privação de glicose e oxigênio (Kim et al., 2004) e promove proteção em um modelo de neurotrauma em ratos (Gilad e Gilad, 2000).

A agmatina apresenta também função anti-amnésica, pois estudos indicam que a agmatina facilita a memória em um modelo de esquiva inibitória em ratos (Arteni et al., 2002).

A agmatina apresenta propriedade ansiolítica, uma vez que a sua administração oral em ratos e em camundongos exerceu um significativo efeito ansiolítico em três modelos animais de ansiedades: teste de transição claro-escuro, teste do conflito de beber de Vogel e teste de interação social (Gong et al., 2006).

Estudos indicam que a agmatina exibe ainda propriedade anticonvulsivante em um modelo de convulsão induzida por eletrochoque (Bence et al., 2003; Su et al., 2004), sendo que este efeito pode ser mediado pela inibição de receptores NMDA (Su et al., 2004). Outros estudos mostram que a agmatina protege contra a convulsão induzida por pentilenotetrazol (Demehri et al., 2003; Feng et al., 2005), um efeito provavelmente mediado por diminuição da liberação de glutamato (Feng et al., 2005).

Santos et al. (2005) mostraram que a agmatina produz um efeito antinociceptivo dose-dependente em modelos animais de dor induzido por ácido acético, glutamato, capsaicina e formalina e este efeito parece ser mediado por uma interação com o sistema opióide, sistema serotoninérgico (5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub>), nitrérgico, bem como interação com  $\alpha_2$ -adrenoceptores e receptores imidazólicos I<sub>1</sub>.

A agmatina produz também um efeito antidepressivo em dois modelos animais preditivos para ação antidepressiva, TNF e TSC em camundongos (Zomkowski et al., 2002).

### **1.2.1. Agmatina e transtornos de humor**

Segundo um estudo de Halaris et al. (1999), pacientes com depressão apresentaram aumentos significativos das concentrações de agmatina no plasma, quando comparado com pacientes controle saudáveis, indicando uma correlação entre depressão e agmatina, provavelmente sendo um efeito compensatório.

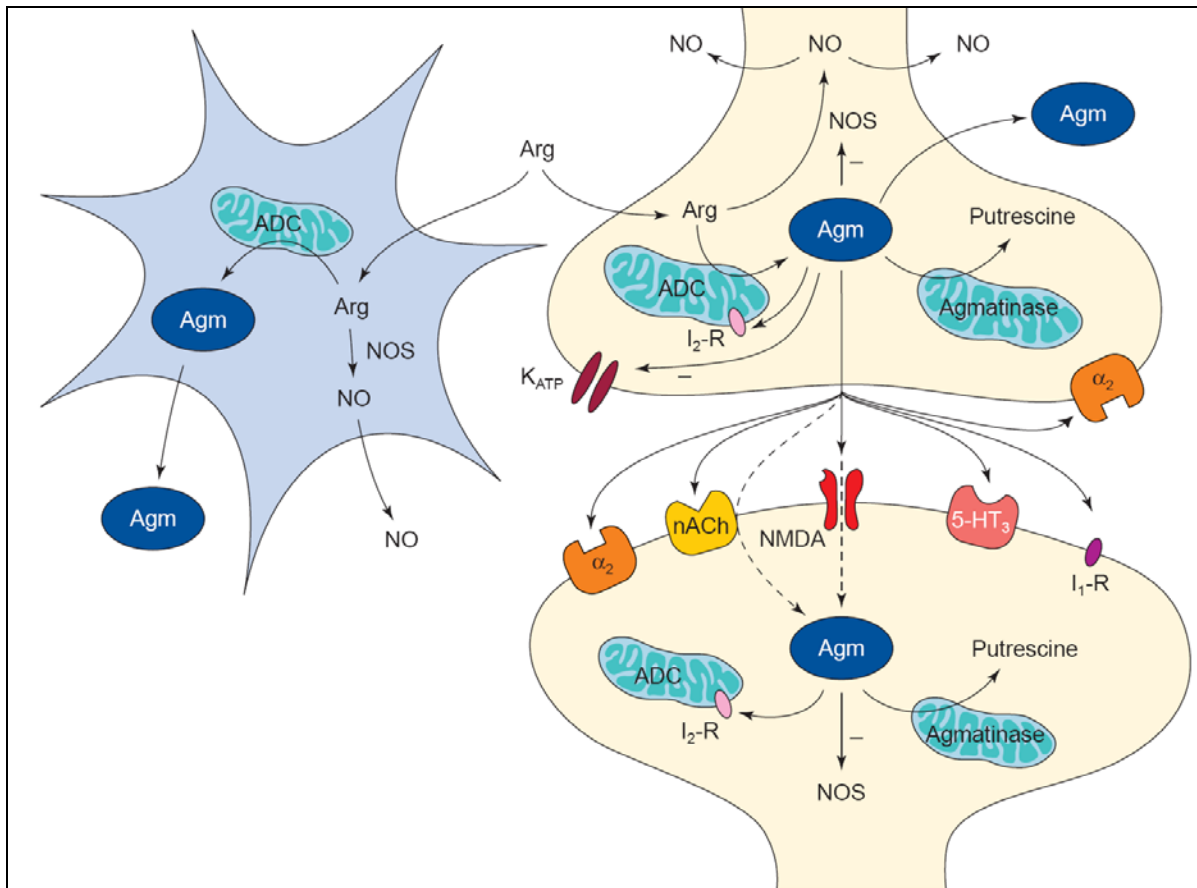
Nosso grupo foi o primeiro a mostrar em 2002 que a administração aguda de agmatina por via sistêmica (intraperitoneal) e central (intracerebroventricular) em camundongos causa efeito antidepressivo no TNF e no TSC (Zomkowski et al., 2002). Um estudo posterior também mostrou o efeito da agmatina (administrada pelas vias oral e subcutânea) no TNF em camundongos e em ratos (Li et al., 2003). O estudo dos mecanismos

de ação responsáveis pela ação antidepressiva da agmatina no TNF mostrou que seu efeito é dependente de uma inibição dos receptores NMDA e da síntese de óxido nítrico (NO) e de uma interação com os sistemas noradrenérgico (receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos), serotoninérgico (receptores 5-HT<sub>1A/1B</sub> e 5-HT<sub>2</sub>), opióide (receptores  $\delta$ - e  $\mu$ -opioides) (Zomkowski et al., 2002, 2004, 2005) e com os receptores imidazólicos I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> (Figura 4) (Zeidan et al., 2007).

Além disso, Li et al. (2006), recentemente demonstraram que a agmatina promove aumento na proliferação de células progenitoras hipocâmpais *in vitro* e também promove neurogênese das células do hipocampo *in vivo*, em camundongos estressados cronicamente. Este efeito, pode ser mediado pela inibição dos receptores NMDA e ser um mecanismo importante envolvido na ação antidepressiva da agmatina.

Contudo, mecanismos de ação adicionais responsáveis pelo efeito antidepressivo da agmatina no TNF, incluindo o envolvimento de canais de potássio, ainda necessita de investigações adicionais.

Em relação ao transtorno bipolar, inexistem estudos relacionando este transtorno com agmatina. Considerando que alguns estabilizadores de humor como a lamotrigina e o lítio apresentam propriedades antidepressivas e antimaníacas (Brugue e Vieta, 2007; Bourin and Prica, 2007), torna-se interessante investigar se a agmatina tem ação antimaníaca, além de propriedades antidepressivas.



**Figura 4.** Esquema de uma sinapse contendo agmatina. A arginina (Arg) entra no terminal neuronal ou na glia via um transportador ou um canal, servindo como substrato da arginina descarboxilase (ADC) mitocondrial para sintetizar agmatina, ou substrato da NOS citoplasmática para formar o NO difusível. A agmatina sintetizada em neurônio ou glia é liberada para o espaço sináptico ou estocada em vesículas e é degradada por agmatinase a putrescina (não mostrado). A agmatina pode bloquear a NOS, interagir com sítios de receptores imidazólicos da subclasse I<sub>2</sub> (I<sub>2</sub>-R) localizados na mitocôndria, inibir canais de K<sub>ATP</sub> ou quando liberada do neurônio, interagir com vários canais iônicos ativados por ligantes (incluindo receptores NMDA, nicotínicos ou 5-HT<sub>3</sub>), ou ligar-se a receptores imidazólicos da subclasse I<sub>1</sub> (I<sub>1</sub>-R) ou  $\alpha_2$ -adrenoceptores. A agmatina pode também entrar em neurônios pós-sinápticos via receptores nicotínicos e possivelmente através de receptores NMDA e ligar-se em receptores I<sub>2</sub>, pode inibir a NOS ou ser metabolizada a putrescina. A agmatina liberada está também presente no soro e pode entrar nas células gliais para modular a expressão e atividade da NOS induzível (retirado de Reis e Regunathan, 2000). Abreviações: Agm, agmatina; Arg, arginina; I<sub>1</sub>-R, receptores imidazólicos do tipo 1; I<sub>2</sub>-R, receptores imidazólicos do tipo 2; nACh, receptor nicotínico de acetilcolina.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os transtornos de humor são altamente prevalentes, heterogêneos e de etiologia multifatorial (Pichini et al., 2004; McIntyre et al., 2006; Prince et al., 2007; Tsankova et al., 2007). Segundo a OMS em 2005, incapacidades provocadas por doenças neuropsiquiátricas, incluindo transtornos de humor, consomem 31,7% da vida de um paciente e entre as doenças que mais contribuem para este prejuízo funcional estão a depressão maior (11,8%), esquizofrenia (2,8%) e transtorno bipolar (2,4%). Estes transtornos estão associados a índices significativos de morbidade, mortalidade e custo econômico (Pichini et al., 2004; Prince et al., 2007).

Na clínica não há ainda um biomarcador para detectar esses transtornos mentais. Conseqüentemente, pacientes psiquiátricos que aparentemente estão “bem” podem ter a doença oculta, com ausência de sintomas e difícil de diagnosticar precisamente (McIntyre et al., 2006). Nestes casos, as anormalidades comportamentais, quando aparecem, são longas e duradouras, portanto estas doenças apresentam um curso crônico, remitante e freqüentemente acometem indivíduos na fase produtiva de suas vidas. Além disso, a reversão dos sintomas em resposta ao tratamento ocorre dentro de semanas ou meses e os medicamentos utilizados para os transtornos neuropsiquiátricos são administrados por um longo período, muitas vezes, dificultando a adesão do paciente ao tratamento (Frangol, 2006; Tsankova et al., 2007).

Apesar dos recentes progressos alcançados no desenvolvimento de fármacos para depressão maior (antidepressivos) e transtorno bipolar (estabilizadores de humor) nos últimos anos, ainda está longe o sucesso terapêutico para estas doenças. A terapia para a depressão, por exemplo, não tem sido totalmente eficaz e, em muitos casos, está associada a efeitos colaterais indesejados, o que prejudica a adesão do paciente ao tratamento (Nestler et al.,

2002a). Além disso, apenas cerca de 60% dos pacientes são responsivos ao tratamento com antidepressivos (Gareri et al., 2000; Berton e Nestler, 2006). Já o tratamento para transtorno bipolar é paliativo, longo e não atende a casos refratários da doença (Müller-Oerlinghausen et al, 2002).

Tendo em vista a grande necessidade de novos agentes terapêutico para a depressão e transtorno bipolar e o papel já bem estabelecido da agmatina como antidepressiva (Li et al., 2003; Zomkowski et al., 2002, 2004, 2005; Zeidan et al., 2007), torna-se relevante ampliar os estudos sobre os seus mecanismos de ação antidepressiva, bem como investigar se esta apresenta efeito em um modelo animal de mania. Esta abordagem permitirá contribuir para a compreensão dos mecanismos de regulação endógena desses transtornos de humor, contribuindo, desta forma, para o futuro desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para controle e/ou remissão dos sintomas associados a estes estados mentais. Além disso, esta pesquisa pode vir a contribuir para uma eventual futura utilização da agmatina ou análogo em associação com antidepressivos ou estabilizadores de humor para reduzir os efeitos colaterais destes fármacos, possibilitando melhor adesão ao tratamento e qualidade de vida dos pacientes ao longo da terapia. Portanto, faz-se necessário investigar se o mecanismo de ação antidepressiva da agmatina envolve canais de potássio, uma vez que, recentes estudos indicam que antidepressivos como fluoxetina, age como um potente inibidor de vários canais iônicos, incluindo canais de  $K^+$  (Choi et al., 2004). Além disso, também, faz-se necessário investigar se a agmatina apresenta efeito em um modelo animal de mania.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar o envolvimento dos canais de  $K^+$  no mecanismo de ação da agmatina no teste do nado forçado e o efeito da agmatina em um modelo animal de mania induzido por ouabaína e sua relação com o estresse oxidativo.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- ❖ Investigar a participação dos canais de  $K^+$  no efeito antidepressivo da administração aguda sistêmica de agmatina no TNF.
- ❖ Verificar o efeito da administração oral de agmatina sobre parâmetros comportamentais (hiperlocomoção) no modelo animal de mania induzido por ouabaína;
- ❖ Verificar o efeito da administração oral de agmatina sobre parâmetros bioquímicos de avaliação de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo no modelo animal de mania induzido por ouabaína;

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Animais**

Camundongos *Swiss*, fêmeas, pesando entre 30-40 g e ratos Wistar machos adultos (250-350 g) mantidos a 22-25°C com livre acesso a água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h (07:00-19:00h) foram utilizados. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do

Departamento de Bioquímica. Todas as manipulações foram feitas entre as 8:00 e 17:00 h, sendo cada animal utilizado somente uma vez. Os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

#### **4.2. Drogas e tratamento**

Para análise do mecanismo de ação antidepressiva da agmatina, envolvendo canais de  $K^+$  no TNF, foram utilizadas drogas que inibem canais de  $K^+$  como apamina, caribdotoxina, tetraetilamônio e glibenclamida, e drogas que ativam canais de  $K^+$  como minoxidil e cromacalim.

Para a avaliação do efeito da agmatina no modelo de mania foi utilizada ouabaína.

Estas drogas foram administradas por via intracerebroventricular (i.c.v.). Todas as drogas foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%). A agmatina foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) no modelo de depressão em camundongos e por via oral (p.o.) no modelo de mania em ratos.

Todas as drogas utilizadas foram adquiridas da Sigma (St Louis, MO, USA).

Os inibidores e ativadores de canais de  $K^+$  foram administrados nos camundongos submetidos ao TNF, por via i.c.v., como descrito por Eckeli et al. (2000). Para a injeção uma agulha 26G foi conectada a uma cânula de polipropileno acoplada a uma microseringa *Hamilton* de 50  $\mu$ l. Os camundongos foram levemente anestesiados com éter e a administração, em um volume de 5  $\mu$ l, realizada com a inserção da agulha, a mão livre, no ventrículo lateral direito ou esquerdo.

Os ratos submetidos ao modelo de mania foram anestesiados com tiopental de sódio (35 mg/kg, 1 ml/kg, i.p.) (Thionembutal Abbott Laboratories) e xilazina (10 mg/kg,



i.m.) (Virbaxyl, Virbac Laboratories) e a cânula foi cirurgicamente implantada no terceiro ventrículo. Eles foram colocados em um estereotáxico (Insight Equipaments, Brazil) para implantar uma cânula de aço (25G, 12 mm de comprimento), 3 mm acima do ventrículo lateral usando as coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1998): plano anterior/posterior 0,9 mm do bregma; plano lateral 1,5 mm e plano ventral 3,5 mm. A cânula foi presa com cimento poliacrílico e este cimento foi ancorado no crânio com parafusos de aço.

O volume de ouabaína ou salina administrados nos animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína foi de 5 µl.

### **4.3. Avaliação comportamental**

#### **4.3.1. Teste do nado forçado**

Neste teste, o animal é submetido a uma situação onde não existe possibilidade de escape, um cilindro plástico (altura 24 cm, diâmetro 10 cm) contendo 19 cm de água a 25°C. No início do teste ele executa movimentos vigorosos na tentativa de escapar, mas logo essa tentativa cessa e ele assume uma postura de imobilidade. O tempo em que o animal permanece imóvel é avaliado durante um período de 6 min. A redução no tempo de imobilidade é o efeito observado após a administração de várias classes de antidepressivos (Porsolt et al., 1977), enquanto que o aumento deste tempo caracterizará um estado “depressivo” dos animais ou um efeito depressogênico de fármacos (Makino et al., 1998; Dunn e Swiergiel, 2005).

#### **4.3.2. Modelo de mania induzido por ouabaína**

Este modelo foi proposto por El-Mallakh et al. (1995) como um modelo agudo de mania e consiste na injeção i.c.v. de ouabaína que é uma droga inibidora da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. A administração da ouabaína em ratos causa hiperlocomção, que é avaliada através da contagem do número de cruzamentos no campo aberto durante 5 minutos.

#### **4.3.3. Teste do campo aberto**

Este teste é utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais. Como fármacos que apresentam um efeito psicoestimulante podem representar um resultado “falso positivo” no TNF, o teste do campo aberto é imprescindível para se determinar a especificidade do efeito antidepressivo. Este teste também foi utilizado para a avaliação da atividade locomotora dos ratos submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína. O teste consiste em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados em um período de 6 minutos é o parâmetro utilizado para avaliar a atividade locomotora (Rodrigues et al., 1996).

#### **4.4. Análise do mecanismo de ação antidepressivo através de estudos farmacológicos *in vivo***

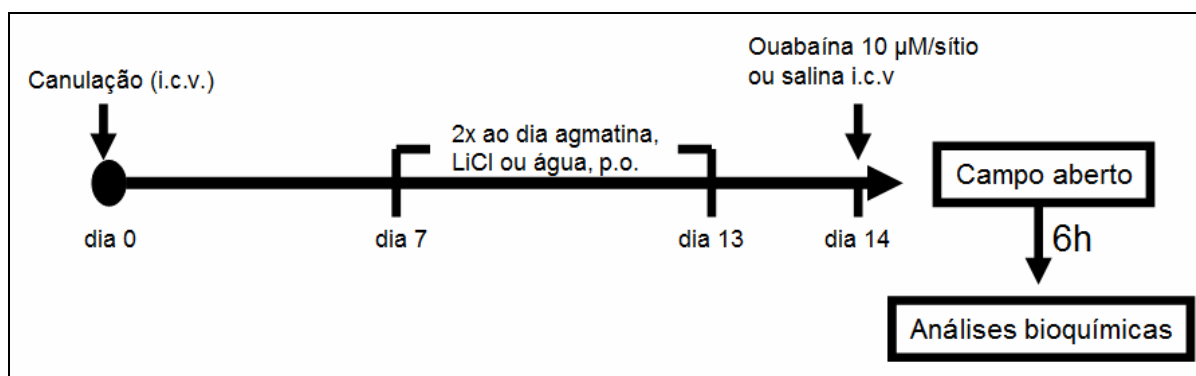
##### **4.4.1. Participação dos canais de $\text{K}^+$ no efeito antidepressivo da agmatina no TNF**

Para investigar a participação dos canais de  $\text{K}^+$  no efeito antidepressivo da agmatina, os animais foram tratados com uma dose sub-ativa de agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) ou veículo e após 20 minutos foram injetados por via i.c.v. com doses sub-ativas de glibenclamida (0,5 pg/sítio, bloqueador de canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP), tetraetilamônio (25 pg/sítio, bloqueador de canais de  $\text{K}^+$  dependentes de voltagem e modulados por  $\text{Ca}^{2+}$ ),

caribdotoxina (25 pg/sítio, bloqueador de canais de  $K^+$  de alta condutância modulados por  $Ca^{2+}$ ), apamina (10 pg/sítio, bloqueador de canais de  $K^+$  de baixa condutância modulados por  $Ca^{2+}$ ) ou veículo. Decorridos 30 minutos os animais foram submetidos ao TNF (Redrobe et al., 1996; Kaster et al., 2005, 2007). Alternativamente os animais foram pré-tratados com cromacalim (10  $\mu$ g/sítio, ativador de canais de  $K^+$ ), minoxidil (10  $\mu$ g/sítio, ativador de canais de  $K^+$ ) ou veículo. Decorridos 30 minutos os animais foram tratados com agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou veículo e submetidos ao TNF após 30 minutos.

#### 4.5. Investigação do efeito da agmatina nas alterações comportamentais e bioquímicas ocasionadas pelo modelo de mania induzido por ouabaína em ratos

##### 4.5.1. Protocolo experimental do modelo de mania



**Figura 5.** Esquema do protocolo utilizado para estudar os efeitos da agmatina no modelo de mania induzido por ouabaína.

Conforme mostrado na Figura 5, a cânula i.c.v. foi inserida no dia zero. O período do tratamento dos animais com agmatina (0,1-10 mg/kg, p.o.) ou cloreto de lítio (LiCl, 45 mg/kg, p.o., controle positivo) foi do 7º. até o 13º. dias. A agmatina e o LiCl foram administrados duas vezes ao dia neste período. No 14º dia, os animais receberam uma injeção de ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.) ou salina. O teste do campo aberto foi realizado no dia 0 (6h antes da canulação), 3 dias após a canulação (para excluir efeitos da cirurgia sobre a atividade locomotora) e no 14º dia (imediatamente após a injeção i.c.v. de ouabaína ou salina).

Decorridas 6 h, os animais foram mortos por decapitação. Os córtices cerebrais e hipocampus foram removidos e homogenizados para posteriores dosagens bioquímicas (Figura 5).

#### **4.5.2. Avaliação do estresse oxidativo nos animais submetidos ao modelo de mania**

Com o objetivo de verificar um possível estresse oxidativo em consequência da administração intracerebroventricular de ouabaína e a reversão deste efeito pela administração de agmatina, foram mensurados os parâmetros antioxidantes: atividade das enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) e os níveis de TBARS como marcador de dano oxidativo, em córtex cerebral e hipocampo dos ratos.

#### **Preparação de extrato dos tecidos**

Após 6 h da administração de ouabaína os animais foram mortos por decapitação e seus encéfalos foram removidos sobre uma placa de Petri invertida colocada sobre o gelo. As estruturas cerebrais (córtex cerebral e hipocampo) foram isoladas e homogeneizadas em tampão HEPES 20 mM, pH 7,4. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 20.000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada (4°C). O sobrenadante foi então separado e conservado a -70°C para posterior dosagem das atividades enzimáticas (GPx e GR).

#### **Avaliação da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)**

A GPx catalisa a redução de  $H_2O_2$ , bem como de outros lipoperóxidos, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-substrato para esta reação e produzindo glutathione oxidada (GSSG). A GSSG é reduzida pela glutathione redutase com o consumo de NADPH,

que pode ser acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm (Wendel, 1981; Flohé e Günzler, 1984). Para este ensaio, o meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, GSH 1mM, NADPH 0,1 mM. Adicionou-se a amostra neste meio para mensurar o consumo inespecífico de NADPH através de uma leitura por 2-4 minutos a 340 nm. Ao decréscimo de absorbância (340 nm) por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ( $\epsilon = 6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 mmol/min.

#### **Avaliação da atividade da enzima glutathiona redutase (GR)**

A GR catalisa a redução da glutathiona oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH. Ao utilizar o substrato GSSG a enzima leva ao consumo de NADPH, que é acompanhado espectrofotometricamente em 340 nm ( $\epsilon = 6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa a atividade enzimática (Calberg e Mannervik, 1985). O meio de reação continha tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0, EDTA 1 mM, NADPH 0,2 mM. Após adicionar a amostra, o consumo inespecífico de NADPH foi mensurado por 2-4 min a 340 nm. Ao adicionar o substrato GSSG 1 mM a leitura foi realizada por 2-4 min adicionais e do decaimento por minuto obtido descontou-se o consumo inespecífico de NADPH. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar de NADPH ( $\epsilon = 6,22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e multiplicado pelas diluições. O valor foi expresso como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 mmol/min.

#### **Mensuração dos níveis de TBARS**

A lipoperoxidação foi estimada pela detecção dos derivados de lipoperóxidos, através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como malonildialdeído (MDA), que devido a peroxidação de lipídios forma um produto de coloração rosa (Ohkawa et al., 1979). Desta forma, neste trabalho utilizaremos o termo lipoperoxidação para nos referir a estas medidas.

Os homogenatos foram incubados em banho-maria com ácido tricloroacético (TCA) 30% durante 30 min, a 37°C. Em seguida, foi adicionado TBA 0,73% a este meio que permaneceu em fervura por 60 min. Após, este período o material foi resfriado durante 15 min a 4°C e posteriormente centrifugado (5 min a 5000 g). A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm.

### **Dosagem de proteínas**

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (1976). A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 595 nm usando albumina de soro bovino como padrão.

### **4.6. Análise estatística**

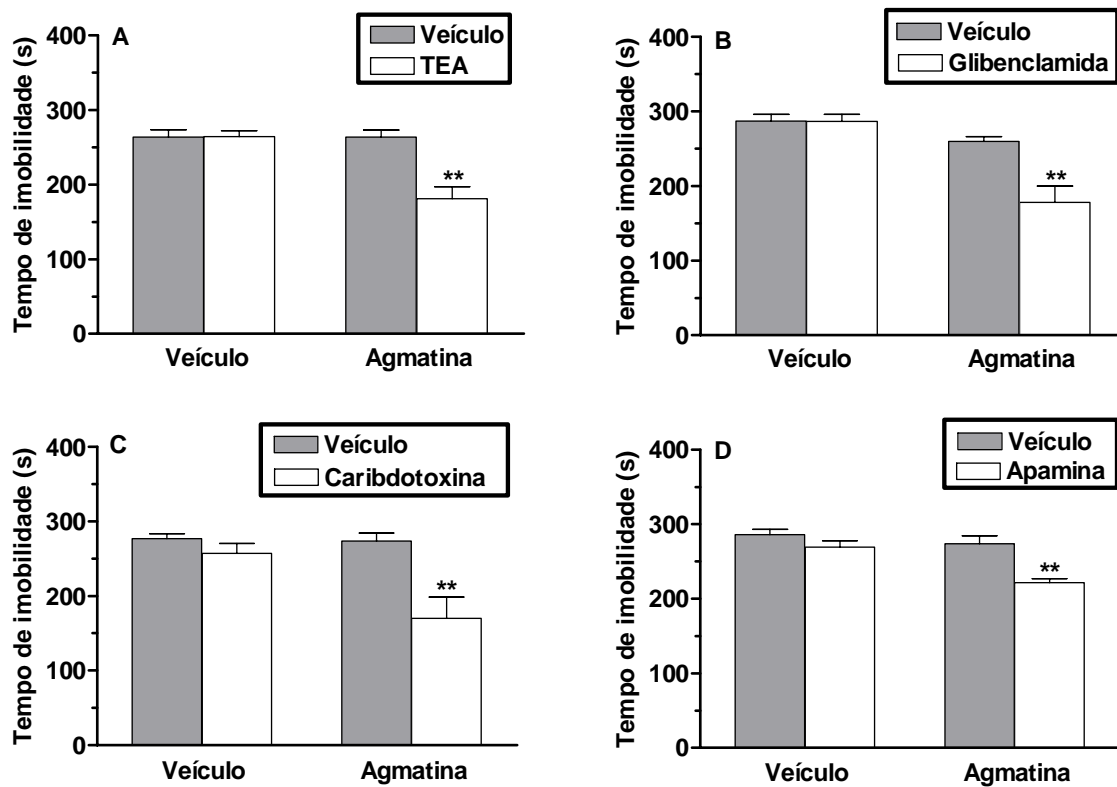
Os resultados obtidos foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias, seguindo o teste de Tukey ou Duncan, quando apropriado. Os resultados foram considerados significativos para  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Efeito da administração de doses sub-ativas de inibidores de canais de K<sup>+</sup> e agmatina no TNF

Os resultados da Figura 6A mostram o efeito do TEA (25 pg/sítio, i.c.v.) em potencializar a ação de uma dose sub-ativa da agmatina no TNF. A ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas do pré-tratamento ( $F_{1,23} = 14,04$ ,  $P < 0,01$ ), tratamento ( $F_{1,23} = 14,18$ ,  $P < 0,01$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,23} = 14,29$ ,  $P < 0,01$ ). A Figura 6B mostra que glibenclamida (0,5 pg/sítio, i.c.v.) foi também capaz de potencializar a ação de uma dose sub-ativa de agmatina no TNF. A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{1,26} = 5,20$ ,  $P < 0,05$ ), tratamento ( $F_{1,26} = 14,19$ ,  $P < 0,01$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,26} = 5,07$ ,  $P < 0,05$ ). Como apresentado na Figura 6C, a administração de caribdotoxina (25 pg/sítio, i.c.v.) produziu um efeito antidepressivo sinérgico quando combinado com a agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{1,20} = 12,93$ ,  $P < 0,01$ ), tratamento ( $F_{1,20} = 6,85$ ,  $P < 0,05$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,20} = 6,02$ ,  $P < 0,05$ ). Os resultados apresentados na Figura 6D mostram o efeito da apamina (10 pg/sítio, i.c.v.) em potencializar a ação de uma dose sub-ativa da agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{1,20} = 16,67$ ,  $P < 0,01$ ), tratamento ( $F_{1,20} = 12,65$ ,  $P < 0,01$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,20} = 4,54$ ,  $P < 0,05$ ).

Como revelado pela análise *post-hoc* de Tukey, a administração dos inibidores de canais de K<sup>+</sup> TEA, glibenclamida, caribdotoxina ou apamina, em doses que não produziram um efeito antidepressivo no TNF, produziu uma redução do tempo de imobilidade quando combinada como uma dose sub-ativa de agmatina, ou seja, um efeito antidepressivo sinérgico.



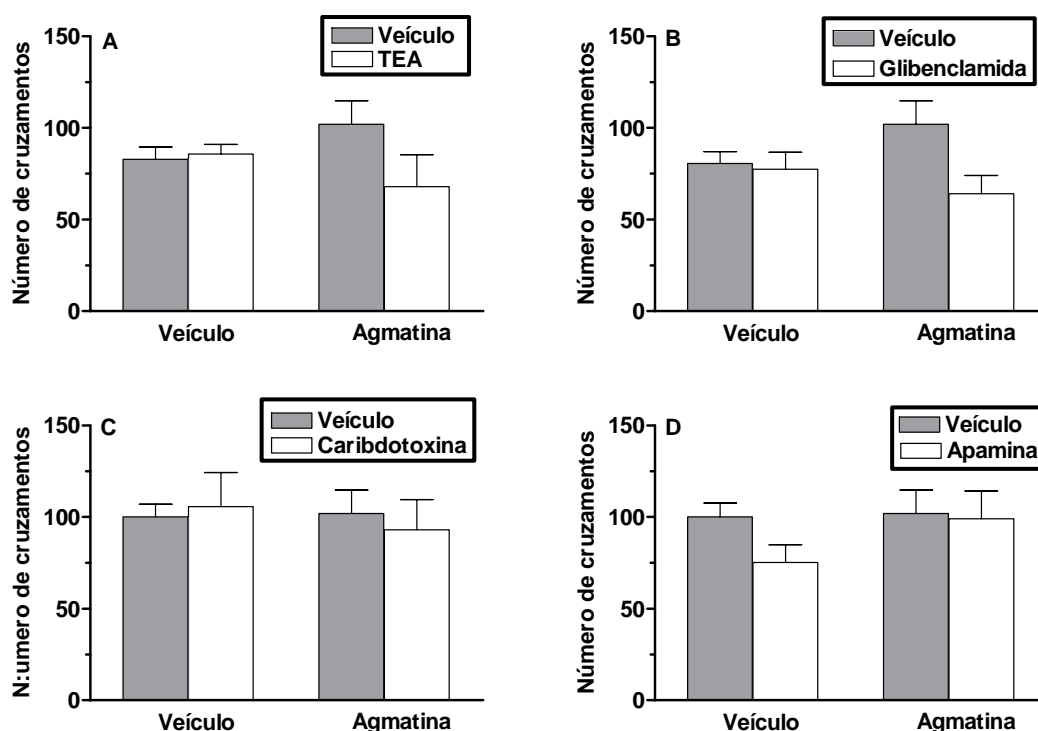
**Figura 6.** Efeito do TEA (25 pg/sítio, i.c.v., painel A), glibenclamida (0,5 pg/sítio, i.c.v., painel B), caribdotoxina (25 pg/sítio, i.c.v., painel C) ou apamina (10 pg/sítio, i.c.v., painel D) em potencializar a ação de uma dose sub-ativa da agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) no TNF. Os valores são expressos como a média + EPM (n=5-11). \*\* $P < 0,01$  quando comparado com o grupo tratado com veículo.

## 5.2. Efeito de inibidores de canais de $K^+$ e agmatina na atividade locomotora espontânea dos animais

Os resultados apresentados na Figura 7A mostram o efeito da administração combinada da agmatina com TEA (25 pg/sítio, i.c.v.) no teste de campo aberto. A ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{1,22} = 2,19$ ,  $P = 0,15$ ), tratamento ( $F_{1,22} = 0,005$ ,  $P = 0,95$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,22} = 3,03$ ,  $P = 0,09$ ). Um similar resultado foi observado com glibenclamida (Figura 7B). A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{1,23} = 4,52$ ,



$P < 0,05$ ), mas não do tratamento ( $F_{1,23} = 0,17$ ,  $P = 0,69$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,23} = 3,20$ ,  $P = 0,09$ ). A Figura 7C mostra o efeito da administração combinada de caribdotoxina e agmatina no teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias não revelou um efeito significativo do pré-tratamento ( $F_{1,19} = 0,01$ ,  $P = 0,91$ ), tratamento ( $F_{1,19} = 0,14$ ,  $P = 0,71$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,19} = 0,26$ ,  $P = 0,61$ ). Um similar resultado foi observado com apamina (Figura 7D). A ANOVA de duas vias não mostrou diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{1,20} = 1,51$ ,  $P = 0,23$ ), tratamento ( $F_{1,20} = 1,31$ ,  $P = 0,26$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,20} = 0,96$ ,  $P = 0,34$ ). Em conclusão, a administração combinada de agmatina com inibidores de canais de  $K^+$  como TEA, glibenclamida, caribdotoxina ou apamina não produziu efeito no comportamento locomotor dos camundongos.

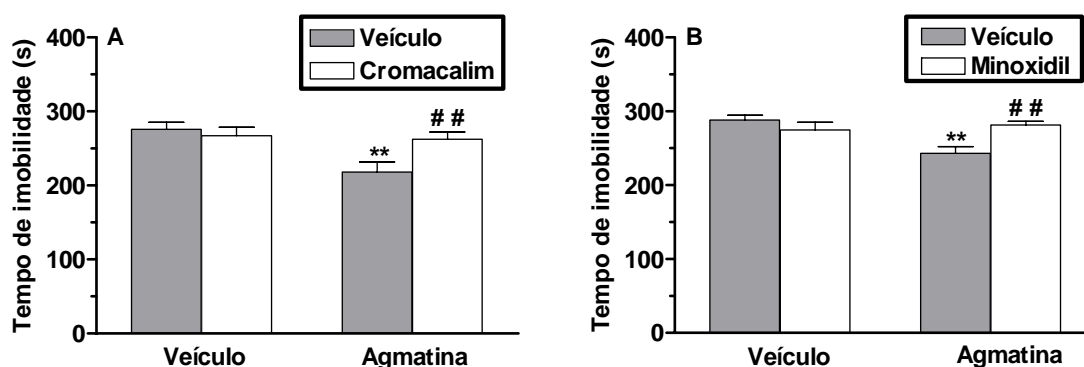


**Figura 7.** Efeito do tratamento dos camundongos com TEA (25 pg/sítio, i.c.v., painel A), glibenclamida (0,5 pg/sítio, i.c.v., painel B), caribdotoxina (25 pg/sítio, i.c.v., painel C) ou apamina (10 pg/sítio, i.c.v., painel D) combinada com uma dose sub-ativa de agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) no teste do campo aberto. Os valores são expressos como a média + EPM (n=5-9).

### 5.3. Efeito do cromacalim ou minoxidil no efeito anti-imobilidade induzido pela agmatina no TNF

A Figura 8A mostra o efeito do pré-tratamento dos camundongos com cromacalim (10 µg/sítio, i.c.v.) sobre a redução do tempo de imobilidade no TNF causada pela administração de agmatina (10 mg/kg, i.p.). A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{1,29} = 5,71$ ,  $P < 0,05$ ), tratamento ( $F_{1,29} = 15,80$ ,  $P < 0,01$ ) e da (interação tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,29} = 11,98$ ,  $P < 0,01$ ). A Figura 8B mostra a influência do pré-tratamento dos camundongos com minoxidil (10 µg/sítio, i.c.v.) no efeito antidepressivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF. A ANOVA de duas vias revelou diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{1,22} = 7,64$ ,  $P < 0,05$ ), tratamento ( $F_{1,22} = 12,82$ ,  $P < 0,01$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,22} = 20,96$ ,  $P < 0,01$ ).

Como revelado pela análise *post-hoc* de Tukey, o pré-tratamento dos animais com minoxidil ou cromacalim preveniu o efeito antidepressivo da dose ativa de agmatina no TNF.

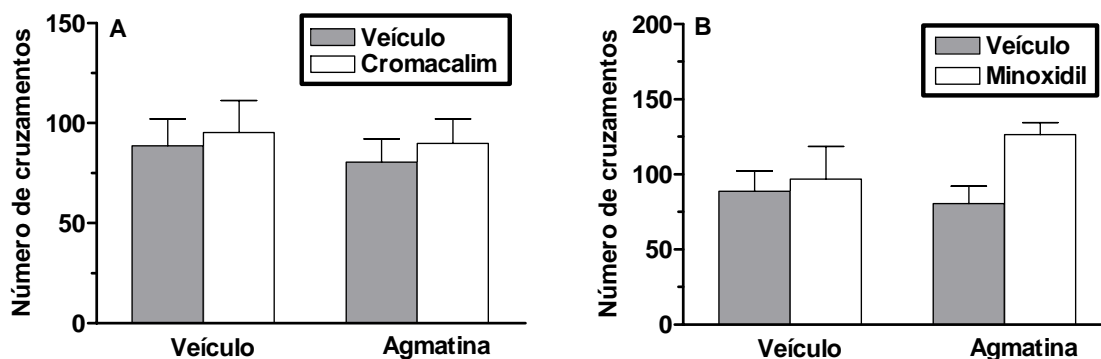


**Figura 8.** Efeito do pré-tratamento dos camundongos com cromacalim (10 µg/sítio, i.c.v., painel A) ou minoxidil (10 µg/sítio, i.c.v., painel B), na redução do tempo de imobilidade induzida pela agmatina (10 mg/kg) no TNF. Os valores são expressos como a média + EPM (n=5-10). \*\* $P < 0,01$  quando comparada com o grupo tratado com veículo. ## $P < 0,01$  quando comparado com o mesmo grupo pré-tratado com veículo.

#### 5.4. Efeito dos ativadores de canais de K<sup>+</sup> e agmatina na atividade locomotora espontânea dos animais

A Figura 9A mostra o efeito de cromacalim (10 µg/sítio, i.c.v.) combinado com agmatina (10 mg/kg, i.p.) no teste do campo aberto. A ANOVA de duas vias não revelou diferenças do pré-tratamento ( $F_{1,22} = 0,35$ ,  $P=0,56$ ), tratamento ( $F_{1,22} = 0,26$ ,  $P=0,62$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,22} = 0,01$ ,  $P=0,92$ ). Um similar resultado foi obtido com o pré-tratamento com minoxidil (10 µg/sítio, i.c.v.) (Figura 9B). A ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{1,19} = 3,50$ ,  $P=0,08$ ), tratamento ( $F_{1,19} = 0,55$ ,  $P=0,46$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{1,19} = 1,72$ ,  $P=0,20$ ).

Desta forma, o pré-tratamento dos animais com minoxidil ou cromacalim não produziu nenhuma mudança no comportamento locomotor dos camundongos.

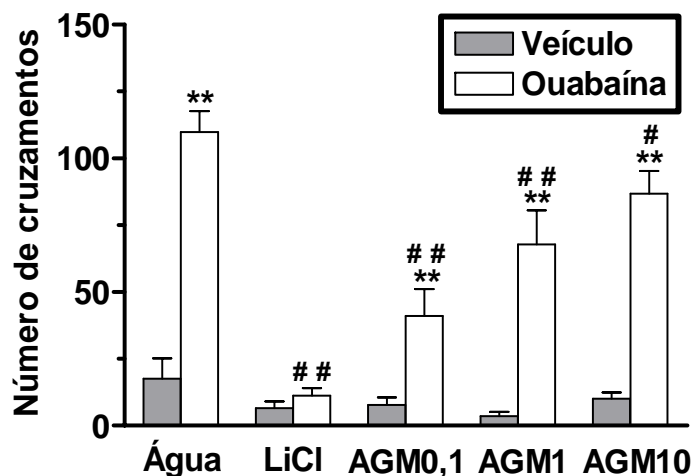


**Figura 9.** Efeito do tratamento dos camundongos com cromacalim (10 µg/sítio, i.c.v., painel A) ou minoxidil (10 µg/sítio, i.c.v., painel B), combinado com uma dose sub-ativa de agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) no teste do campo aberto. Valores são expressos como a média + EPM (n=5-7).

### **5.5. Efeito comportamental da agmatina e LiCl no modelo animal de mania induzido por ouabaína em ratos**

A inserção da cânula não alterou a atividade locomotora dos ratos submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína (dados não mostrados). Na Figura 10 estão representados os resultados do pré-tratamento dos ratos com agmatina (0,1-10 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia por sete dias consecutivos, no efeito hiperlocomotor causado pela administração da ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.). A ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas do pré-tratamento ( $F_{4,49} = 18.07$ ,  $P < 0,01$ ), do tratamento ( $F_{1,49} = 145,32$ ,  $P < 0,01$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{4,49} = 12,50$ ,  $P < 0,01$ ).

Como revelado pela análise *post-hoc* de Duncan o tratamento dos animais com ouabaína induziu um aumento na atividade locomotora, e o pré-tratamento dos ratos com LiCl (45 mg/kg) bloqueou completamente a hiperlocomotoção elicitada pela ouabaína e agmatina (0,1-10 mg/kg) bloqueou parcialmente o efeito da ouabaína sobre a locomoção.



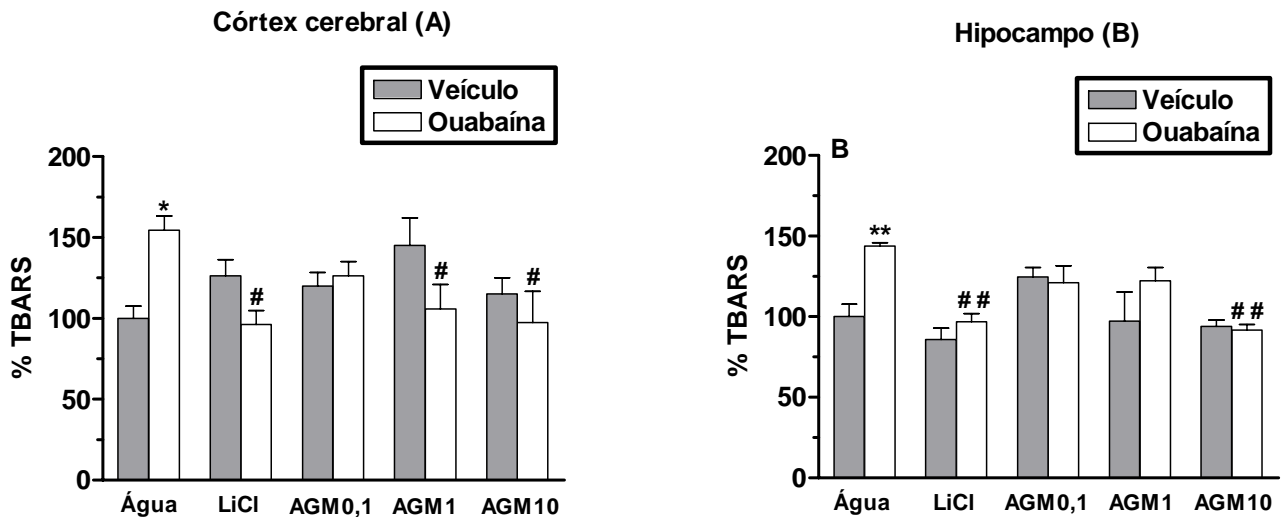
**Figura 10.** Efeito do pré-tratamento dos ratos com agmatina (AGM; 0,1-10 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia durante 7 dias consecutivos, na hiperlocomoção induzida por ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.). Os valores estão expressos como a média + EPM (n=5-7). \*\* $P < 0,01$  quando comparada com o grupo tratado com veículo. # $P < 0,05$  e ## $P < 0,01$  quando comparado com o grupo pré-tratado com água e tratado com ouabaína.

#### 5.6. Efeito da agmatina e LiCl sobre o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína

Na Figura 11 estão representados os resultados do pré-tratamento dos ratos com agmatina (0,1-10 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia por sete dias consecutivos, no nível de TBARS no modelo de mania induzido pela ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.) no córtex cerebral (Figura 11 A) e hipocampo (Figura 11 B) de ratos. No córtex cerebral a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{4,46} = 3,88$ ,  $P < 0,01$ ), mas não do pré-tratamento ( $F_{4,46} = 0,87$ ,  $P = 0,49$ ) e do tratamento ( $F_{1,46} = 0,34$ ,  $P = 0,56$ ). No hipocampo, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas do pré-tratamento ( $F_{4,38} = 6,60$ ,  $P < 0,01$ ), tratamento ( $F_{1,38} = 7,60$ ,  $P < 0,01$ ) e interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{4,38} = 2,78$ ,  $P < 0,05$ ).

Como revelado pela análise *post-hoc* de Duncan, o tratamento dos animais com ouabaína induziu um aumento no nível de TBARS no córtex cerebral e hipocampo, e o pré-

tratamento dos ratos com LiCl (45 mg/kg) e com agmatina na dose de 10 mg/kg preveniu esta mudança induzida por ouabaína nas duas estruturas, e somente no córtex cerebral a agmatina na dose de 1 mg/kg também preveniu este aumento.

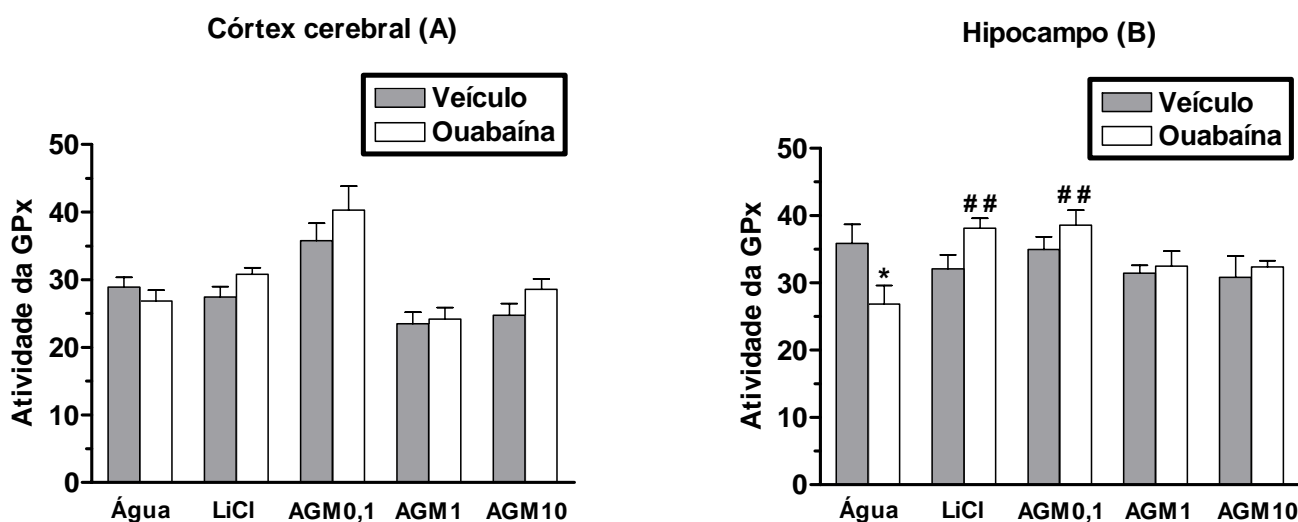


**Figura 11.** Efeito do pré-tratamento dos ratos com agmatina (AGM; 0,1-10 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia durante 7 dias consecutivos, no aumento dos níveis de TBARS no córtex cerebral (painel A) e hipocampo (painel B) dos animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.). Os valores estão expressos como média + EPM (n=4-7). \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ , quando comparado com o grupo tratado com veículo. # $P < 0,05$  e ## $P < 0,01$ , quando comparado com o grupo pré-tratado com água e tratado com ouabaína

### **5.7. Efeito da agmatina e LiCl sobre a atividade da glutathione peroxidase (GPx) no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína**

A Figura 12 mostra os resultados do pré-tratamento dos ratos com agmatina (0,1-10 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia por sete dias consecutivos, na atividade da GPx no modelo de mania induzido por ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.), no córtex cerebral (Figura 12A) e no hipocampo (Figura 12B) de ratos. No córtex cerebral a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa do pré-tratamento ( $F_{4,47} = 14,71$ ,  $P < 0,01$ ), mas não do tratamento ( $F_{1,47} = 2,71$ ,  $P = 0,11$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{4,47} = 0,97$ ,  $P = 0,44$ ). No entanto, no hipocampo, a ANOVA de duas vias mostrou diferença significativa da interação entre tratamento e pré-tratamento ( $F_{4,40} = 3,52$ ,  $P < 0,05$ ), mas não do pré-tratamento ( $F_{4,40} = 2,47$ ,  $P = 0,06$ ) e tratamento ( $F_{1,40} = 0,21$ ,  $P = 0,65$ ).

Como revelado pela análise *post-hoc* de Duncan, o tratamento dos animais com ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.) elicitou uma redução da atividade da GPx no hipocampo, e o pré-tratamento dos ratos com LiCl (45 mg/kg) e agmatina (0,1 mg/kg) preveniu esta redução na atividade da GPx.



**Figura 12.** Efeito do pré-tratamento dos ratos com agmatina (AGM; 0,1-10 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia, durante 7 dias consecutivos, na atividade da enzima GPx dos animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.), no córtex cerebral (painel A) e hipocampo (painel B). Valores são expressos como a média + EPM (n=4-6). \* $P < 0,05$  quando comparada com o grupo tratado com veículo. ## $P < 0,01$ , quando comparado com o grupo pré-tratado com água e tratado com ouabaína.

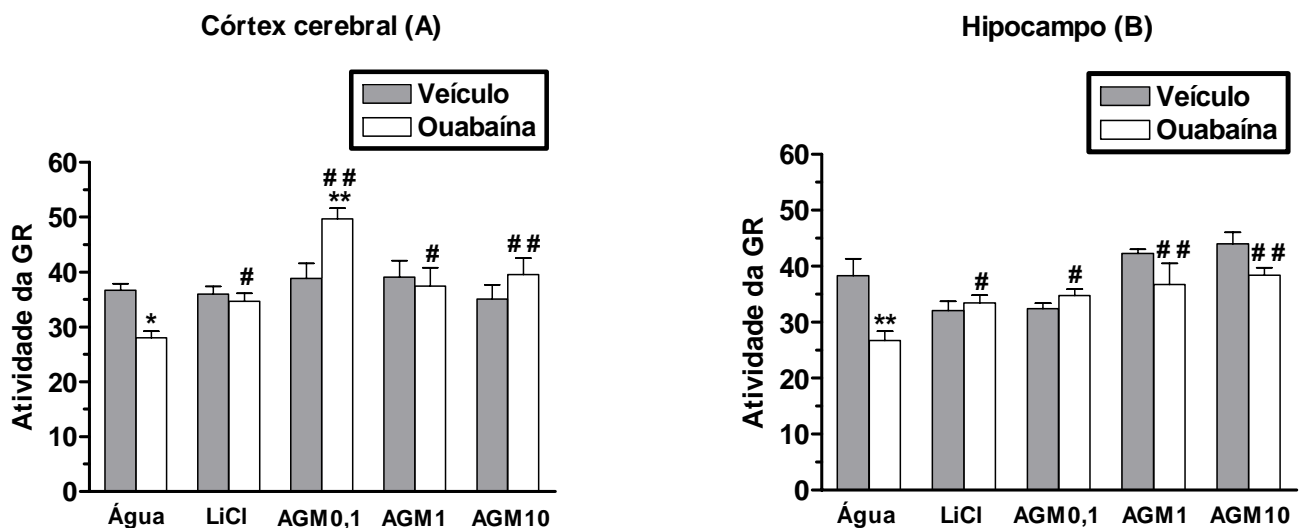
### 5.8. Efeito da agmatina e LiCl sobre a atividade da glutathione redutase (GR) no córtex cerebral e hipocampo de animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína

A Figura 13 mostra os resultados do pré-tratamento dos ratos com agmatina (0,1-10 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia por sete dias consecutivos, na atividade da GR no modelo de mania induzida por ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.), no córtex cerebral (Figura 13A) e no hipocampo (Figura 13B) de ratos. No córtex cerebral, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas do pré-tratamento ( $F_{4,48} = 7,47$ ,  $P < 0,01$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{4,48} = 5,12$ ,  $P < 0,01$ ), mas não do tratamento ( $F_{1,48} = 0,26$ ,  $P = 0,61$ ). No hipocampo, a ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas do



pré-tratamento ( $F_{4,40} = 8,49$ ,  $P < 0,01$ ), tratamento ( $F_{1,40} = 9,11$ ,  $P < 0,01$ ) e da interação (tratamento x pré-tratamento) ( $F_{4,40} = 4,21$ ,  $P < 0,01$ ).

Como revelado pela análise *post-hoc* de Duncan, o tratamento dos animais com ouabaína induziu uma redução na atividade da GR, no córtex cerebral e hipocampo, e o pré-tratamento dos ratos com LiCl (45 mg/kg) e agmatina (0,1-10 mg/kg) preveniram a redução da atividade desta enzima. Além disso, no córtex cerebral, o pré-tratamento com a agmatina, na dose de 0,1 mg/kg e tratamento com ouabaína promoveu um aumento significativo da atividade da GPx em relação ao controle.



**Figura 13.** Efeito do pré-tratamento dos ratos com agmatina (AGM; 0,1-10 mg/kg, p.o.), LiCl (45 mg/kg, p.o.) ou água, duas vezes ao dia durante 7 dias consecutivos, na atividade da GR dos animais submetidos ao modelo de mania induzido por ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.), no córtex cerebral (painel A) e hipocampo (painel B). Os valores estão expressos como média + EPM (n=4-7). \* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ , quando comparado com o grupo tratado com veículo. # $P < 0,05$  e ## $P < 0,01$ , quando comparado com o grupo pré-tratado com água e tratado com ouabaína.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho estendem os dados da literatura sobre os mecanismos de ação antidepressiva da agmatina, uma vez que indicam que o seu efeito antidepressivo em camundongos no TNF é dependente de uma inibição de diferentes tipos de canais de  $K^+$ . Os resultados indicam também que a agmatina parece possuir efeito antimaníaco, uma vez que é capaz de proteger, parcialmente, contra a hiperlocomoção induzida por ouabaína em um modelo animal de mania em ratos. Além disso, a agmatina foi capaz de reverter o aumento no nível de TBARS, elicitado por ouabaína, e proteger contra a redução da atividade de enzimas antioxidantes, GPx e GR, induzida por ouabaína, em estruturas como o córtex cerebral e hipocampo de ratos submetidos ao modelo animal de mania induzido por ouabaína, indicando que o seu efeito antimaníaco pode ser devido, pelo menos em parte, as suas propriedades antioxidantes.

O envolvimento dos canais de  $K^+$  no efeito antidepressivo da agmatina foi avaliado no TNF. Este é um modelo animal com validade preditiva para avaliação da atividade antidepressiva em camundongos e ratos. É um modelo experimental que tem sido amplamente utilizado na pesquisa de drogas com potencial antidepressivo, tendo em vista que a grande maioria das classes de antidepressivos reduz o tempo de imobilidade nestes testes. No TNF os camundongos nadam em um espaço restrito do qual não existe forma de escapar. Os animais inicialmente executam movimentos vigorosos na tentativa de escapar, mas alguns minutos após a agitação inicial essa tentativa cessa e adotam uma postura de imobilidade (Porsolt et. al., 1977; Cryan et al., 2002; Nestler et al., 2002a/b; Cryan e Slaterry, 2007).

O tratamento dos animais com fármacos capazes de bloquear diferentes tipos de canais de  $K^+$ , como TEA, glibenclamida, caribdotoxina e apamina, foram capazes de causar um efeito sinérgico com uma dose sub-ativa da agmatina (0,001 mg/kg, i.p.) no TNF. A

agmatina ou os inibidores de canais de  $K^+$ , sozinhos, nestas doses, não alteraram a resposta comportamental dos camundongos no TNF. Em contraste, a combinação do tratamento com doses sub-ativas, inativas comportamentalmente, da agmatina com diferentes inibidores de canais de  $K^+$  provocaram uma robusta redução no tempo de imobilidade, indicativo de um perfil comportamental tipo antidepressivo.

Os canais de  $K^+$  desempenham um papel importante na manutenção do potencial de repouso da membrana, causando repolarização da membrana depois do disparo neuronal e medeiam a ação de vários neurotransmissores, como a serotonina (Wickenden, 2002; Henoré, 2007). Diferentes tipos de canais de  $K^+$  foram identificados no SNC, especificamente canais ativados por voltagem e ativados por  $Ca^{2+}$  (canais Kv e Kca, respectivamente). Contudo, os neurônios possuem correntes de  $K^+$  menos definidas, como a corrente de repouso ou a corrente induzida por um ligante (Wickenden, 2002). O tetraetilamônio (TEA) é um composto quaternário de amônio capaz de bloquear canais de  $K^+$  dependentes de voltagem (canais Kv); no entanto, eles não são seletivos para um tipo particular de canais Kv (podem bloquear alguns canais Kca em altas concentrações) (Mathie et al., 1998; Kaczorowski e Garcia, 1999). Os canais dependentes de voltagem são ativados em resposta a mudanças no potencial de membrana. Estes canais agem contrariamente a influências despolarizantes na célula e são importantes na repolarização de potenciais de ação (Wickenden, 2002). De acordo com nossos resultados, o efeito sinérgico da agmatina com TEA, indica que o mecanismo de ação antidepressiva da agmatina pode envolver a inibição de diferentes tipos de canais de  $K^+$  (ativados por voltagem e/ou ativados por  $Ca^{2+}$ ), uma vez que TEA inibe canais de  $K^+$  de maneira não específica.

Os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  não são tão numerosos quanto os canais Kv, eles são ativados quando a concentração citoplasmática de  $Ca^{2+}$  está aumentada, mas alguns deles são também sensíveis à voltagem (Vergara et al., 1998; Vogalis et al., 2003). Estes

canais previnem a entrada excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  e estão envolvidos na inibição da liberação de neurotransmissores. Eles são classificados em três famílias diferentes e são usualmente nomeados como canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  de alta (big, BK), intermediária (IK) e baixa (SK) condutância (Vergara et al., 1998). Apamina, um peptídeo que compõe o veneno de abelha *Apis mellifera*, e caribdotoxina, um peptídeo que compõe o veneno de escorpião *Leiurus quinquestriatus*, bloqueiam especificamente a corrente através de canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ . Os canais de  $\text{K}^+$  BK, ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ , são sensíveis à inibição por caribdotoxina (Nelson e Quayle, 1995), enquanto canais de  $\text{K}^+$  SK ativados por  $\text{Ca}^{2+}$  são sensíveis à apamina extracelular (Stocker, 2004). Nossos dados demonstraram um efeito sinérgico da agmatina tanto com apamina, quanto com caribdotoxina, um resultado que confirma os dados anteriores obtidos com TEA, de que o mecanismo de ação antidepressiva da agmatina pode envolver a inibição de canais de  $\text{K}^+$  ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ , mais especificamente, canais de  $\text{K}^+$  de alta condutância ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Os canais de  $\text{K}^+$  também são numerosos e desempenham um papel importante na manutenção do potencial de repouso da membrana em muitas células. Duas famílias destes canais Kir são particularmente importantes: os canais de potássio retificadores regulados pela proteína (GIRK or Kir3) e canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ). As sulfoniluréias, como a glibenclamida, bloqueiam canais de potássio sensíveis a ATP em neurônio (Clapp, 1995). Os dados do presente estudo mostraram que a administração de doses sub-ativas de agmatina e glibenclamida, apresentaram um efeito sinérgico, no TNF em camundongos, corroborando com os dados anteriores com TEA, caribdotoxina e apamina, indicando que as propriedades antidepressivas da agmatina pode se dar, pelo menos em parte, por uma inibição de canais de potássio sensíveis a ATP e canais de  $\text{K}^+$  de alta condutância ativados por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Inan et al. (2004) mostraram que a administração de sertralina, um inibidor seletivo de recaptação de 5-HT, potencializou o efeito antidepressivo do TEA e da 3,4-

diaminopiridina, dois bloqueadores de canais de  $K^+$ . Além disso, a administração de gliburida (um inibidor de canais de  $K^+$  sensível a ATP) ou quinina (um bloqueador de canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$ ), produz um efeito antidepressivo no TNF quando combinado com vários tipos de antidepressivos (Guo et al., 1995, 1996). Em adição, um trabalho recente de Heurteaux et al. (2006) demonstrou que a deleção de um gene que codifica para TREK-1, pode induzir a resistência à depressão em modelos animais, sugerindo alterações na função e regulação destes canais pode alterar o humor e pode ser um alvo potencial para novos antidepressivos. Em síntese, ativadores de canais de potássio induzem um efeito depressivo, por induzir a hiperpolarização de neurônios, enquanto que bloqueadores de canais de potássio produzem um efeito tipo antidepressivo em modelos animais de depressão por inibir a hiperpolarização e então induzir um aumento da resposta excitatória dos neurônios (Galeotti et al., 1999). Nossos resultados corroboram com estes dados, uma vez que a administração sistêmica de agmatina combinada com a administração central de inibidores de canais de  $K^+$  promoveu um efeito sinérgico, indicando que a agmatina pode agir inibindo canais de  $K^+$ , talvez por inibir a hiperpolarização da membrana neuronal e induzir um aumento da excitação dos neurônios. Porém, estudos adicionais precisam ser realizados para confirmar esta hipótese.

Foi demonstrado previamente que a agmatina produz um efeito tipo antidepressivo no TNF por um mecanismo que parece envolver a inibição de receptores NMDA e a síntese de NO (Zomkowski et al., 2002). Corroborando com nossos dados, foi mostrado que a agmatina inibe todas as isoformas da NOS (Galea et al., 1996; Raasch et al., 2001; Moinard et al., 2005), e bloqueia canais iônicos como os receptores NMDA (Yang and Reis, 1999; Li et al., 2003). No cérebro, NO é produzido principalmente em estruturas pós-sinápticas em resposta a ativação de receptores NMDA (Denninger e Marletta, 1999). Considerando que os canais de  $K^+$  representam um dos maiores alvos *downstream* regulados

pela ativação de receptores NMDA e pelo aumento da síntese de NO, não é surpresa esperar que a inibição de receptores NMDA e a inibição da produção de NO elicitada por agmatina pode também refletir uma inibição dos canais de  $K^+$ . Em adição, foi mostrado que poliaminas como espermina, espermidina e putrescina sintetizadas a partir da agmatina, bloqueiam receptores NMDA e diferentes tipos de canais de  $K^+$  (Williams, 1997).

A atividade locomotora no campo aberto pode refletir a ativação de um sistema neural diferente daquela atividade de esforço na situação de nado forçado. Contudo, compostos que aumentam a atividade locomotora, em geral, causam hiperatividade no teste do campo aberto com redução da imobilidade no TNF, representando um “falso positivo” como a cafeína (Rodrigues et al., 2005). Portanto, para excluir a possibilidade de que o efeito sinérgico da agmatina e inibidores de canais de  $K^+$  no TNF, tenha sido em função do aumento da atividade locomotora, foi observada também a locomoção dos camundongos no teste de campo aberto. Porém, a habilidade dos inibidores de canais de  $K^+$  em aumentar a resposta comportamental da agmatina no TNF não é devido a um efeito locomotor estimulante não-específico da combinação destes inibidores com agmatina, uma vez que os resultados mostraram que os inibidores de canais de  $K^+$  sozinhos ou administrado em combinação com agmatina não alteraram a atividade locomotora dos animais.

Para reforçar nossa hipótese de que o efeito antidepressivo da agmatina é dependente, pelo menos em parte, da inibição de diferentes tipos de canais de  $K^+$ , foi demonstrado que a ativação de canais de  $K^+$  elicitada por cromacalim ou minoxidil foi capaz de prevenir a diminuição do tempo de imobilidade em camundongos induzido por uma dose ativa de agmatina (10 mg/kg, i.p.) no TNF, sem mudanças no comportamento locomotor no teste de campo aberto. Cromacalim e minoxidil são compostos que abrem canais de  $K^+$  e tem alta sensibilidade a canais  $K_{ATP}$  (Clapp, 1995), e aumentam o tempo de imobilidade no TNF (Galeotti et al., 1999). Reforçando a idéia de que a inibição de canais de  $K^+$  está envolvida no

mecanismo de ação de fármacos antidepressivos, o pré-tratamento de camundongos com cromacalim foi capaz de antagonizar o efeito anti-imobilidade de vários antidepressivos como imipramina, amitriptilina, desipramina e paroxetina (Redrobe et al., 1996).

Em conclusão, a inibição de diferentes tipos de canais de  $K^+$  aumenta o efeito antidepressivo da agmatina, uma poliamina endógena que age via mecanismo dependente da inibição de receptores NMDA e da via L-arginina-NO no TNF. Juntos estes resultados suportam a idéia de que o efeito modulatório da agmatina na excitabilidade neuronal, via inibição de canais de  $K^+$ , pode representar uma via final de seu efeito tipo antidepressivo no TNF.

Além do efeito tipo antidepressivo bem estabelecido da agmatina, via receptores NMDA, L-arginina-NO, sistema noradrenérgico, serotoninérgico, opióide, imidozólicos (Zomkowski et al., 2002, 2004, 2005; Zeidan et al., 2007) e via inibição de canais de potássio, estabelecido neste estudo, procurou-se investigar se a agmatina além do seu efeito antidepressivo, apresenta efeito em um modelo animal de mania. Com este objetivo, foi utilizado um modelo animal de mania, hiperlocomoção em ratos induzido por ouabaína (i.c.v.) (El-Mallakh et al., 1995; Li et al., 1997; El-Mallakh et al., 2003). A disponibilidade de modelos animais pode acelerar as pesquisas acerca do transtorno bipolar por melhorar o entendimento da patofisiologia deste transtorno e fornecer a possibilidade da descoberta de novos fármacos, pré-clinicamente, para posterior avaliação clínica (El-Mallakh et al., 2003; Herman et al., 2007). Um modelo animal para ser confiável deve preencher, pelo menos, três critérios importantes. Primeiro, para a validade fenomenológica ou de *face*, o animal deve apresentar comportamentos similares àqueles encontrados em humanos com a doença. Segundo, para a validade de *constructo*, a patogênese das anormalidades comportamentais deve ser a mesma, ou pelo menos, similar à condição em humanos. Terceiro, para a validade

*preditiva*, fármacos que são utilizados na clínica para a doença, devem ser hábeis em reverter a sintomatologia da doença no modelo animal (Herman et al., 2007).

O modelo animal de mania induzido por ouabaína preenche todos estes três critérios. Primeiro, reproduz uma das principais mudanças comportamentais, vista em humanos com a doença, a hiperlocomoção. Este sintoma em humanos, observado principalmente na fase da mania, é designado, de acordo com o DSM-IV, como agitação psicomotora. Segundo, a hiperatividade nos animais é causada por inibição da atividade bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase, que está diminuída também em humanos. Finalmente, fármacos como o lítio, carbamazepina e haloperidol, que são utilizados na clínica para o tratamento do transtorno bipolar, reverteram mudanças comportamentais induzidas neste modelo animal (El-Mallakh e Wyat, 1995; Li et al., 1997; El-Mallakh et al., 2003; Herman et al., 2007; Young et al., 2007). Portanto, este modelo parece um modelo animal adequado para estudar pré-clinicamente a patofisiologia do transtorno bipolar e testar novos compostos que possam agir futuramente na terapia para esta doença.

Neste estudo, a administração de ouabaína (50 pmol/sítio, i.c.v.) induziu um aumento robusto na locomoção dos animais no teste do campo aberto. Nossos dados corroboram com a literatura, de que a administração de ouabaína elicitava comportamento hiperativo em ratos (El-Mallakh e Wyat, 1995; Li et al., 1997; El-Mallakh et al., 2003; Herman et al., 2007). A hiperlocomoção induzida por ouabaína foi revertida completamente pela administração oral por 7 dias consecutivos com cloreto de lítio ( $\text{LiCl}$ , 45 mg/kg, controle positivo) e parcialmente por agmatina (0,1-10 mg/kg). Estes resultados sugerem que a agmatina, pelo menos parcialmente, pode prevenir a redução da atividade da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - ATPase, induzida por ouabaína. Portanto, agmatina parece ter efeito antimaníaco. Este é o primeiro achado que relaciona agmatina com transtorno bipolar.



Além disso, o presente estudo avaliou parâmetros oxidativos no córtex cerebral e hipocampo dos animais submetidos ao modelo de mania induzido pela administração de ouabaína. Está bem descrito na literatura que a patofisiologia do transtorno bipolar está envolvida com um desbalanço entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante, ou seja, com o estresse oxidativo (Frey et al., 2007; Kuloglu et al., 2002; Machado-Vieira et al., 2007; Ozcan et al., 2004; Ranjekar et al., 2003). Além disso, alguns dados da literatura indicam que o tratamento crônico com lítio e valproato inibem a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas *in vitro* (Shao et al., 2005; Wang et al., 2003) e lítio e valproato exercem um efeito protetor contra o estresse oxidativo em um modelo animal de mania induzido por anfetamina (Frey et al., 2006b). Além disso, o tratamento com lítio diminui o nível de TBARS no plasma de pacientes com transtorno bipolar (Aliyazicioglu et al., 2007; Machado-Vieira et al., 2007).

No presente estudo foi mostrado que a ouabaína induziu um aumento no nível de TBARS no córtex cerebral e hipocampo dos ratos, sugerindo que o estresse oxidativo pode estar relacionado com as alterações comportamentais produzidas pela ouabaína. O pré-tratamento dos animais com LiCl (45 mg/kg) e agmatina (10 mg/kg) preveniu o aumento do nível de TBARS no córtex cerebral e hipocampo dos ratos. Somente no córtex cerebral, a agmatina (1 mg/kg) também preveniu este aumento. Corroborando com nossos dados, alguns estudos mostram que há um aumento no nível de TBARS no plasma de pacientes com transtorno bipolar (Kuloglu et al., 2002; Machado-Vieira, 2005; Ozcan et al., 2004). Estabilizadores de humor como o lítio, podem prevenir o aumento da peroxidação lipídica na fase da mania em humanos (Machado-Vieira et al., 2007) e *in vitro* (Shao et al., 2005; Wang et al., 2003). Além disso, dados mostram que a agmatina apresenta propriedades neuroprotetora podendo proteger contra injúrias cerebrais, como lipoperoxidação, uma vez que, a administração de agmatina induziu uma redução no nível de peroxidação lipídica no cérebro, podendo esta, modular as espécies reativas de oxigênio induzidas por

lipoperoxidação em camundongos (Sener et al., 2001). Portanto, com os resultados do presente estudo, é possível observar que tanto o LiCl quanto a agmatina podem prevenir as alterações neuroquímicas, como a peroxidação lipídica, induzidas por ouabaína, em um modelo animal de mania.

Este estudo também demonstrou que a atividade da GPx foi reduzida no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de mania pela administração de ouabaína. No entanto, o pré-tratamento dos animais com LiCl ou agmatina (0,1 mg/kg), reverteu significativamente a redução da atividade da GPx. Nossos resultados estão de acordo com achados da literatura, de que no transtorno bipolar pode haver uma redução na atividade da enzima GPx em eritrócitos (Ozcan et al., 2004). Uma vez que a função bioquímica da enzima GPx é reduzir hidroperóxidos lipídios para seus álcoois correspondente e reduzir peróxidos de hidrogênio para água, age como um potente agente antioxidante, detoxificando lipoperóxidos (Dringen et al., 2005). Portanto, de acordo com nossos dados, a agmatina pode agir neste modelo animal de mania, induzindo um aumento na atividade da GPx, diante de um insulto com a administração de ouabaína. Em contraste, no córtex cerebral não houve nenhuma alteração na atividade da enzima GPx, porém a explicação para este efeito ainda não está claro, necessitando, portanto, novas investigações.

Além disso, foi avaliado neste modelo animal de mania, a atividade da enzima GR. O tratamento dos animais com ouabaína induziu uma redução significativa na atividade da GR, tanto no córtex cerebral, quanto no hipocampo. O pré-tratamento dos ratos com LiCl e agmatina (0,1-10 mg/kg) preveniu significativamente a redução da atividade desta enzima elicitada por ouabaína. Além disso, no córtex cerebral a agmatina promoveu um aumento significativo da atividade da enzima GR. De acordo com a literatura, a função bioquímica da GR é reduzir a glutathiona dissulfeto (GSSG) para a sua forma reduzida GSH, um importante antioxidante celular (Dringen et al., 2005). Portanto, de acordo com nossos dados, a agmatina

pode agir protegendo contra o estresse oxidativo induzido por ouabaína em um modelo animal de mania por promover aumento na atividade da enzima GR.

Portanto, a agmatina é um composto endógeno, com muitas funções biológicas, incluindo propriedades neuroprotetora, anti-aminésica, ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva (Olmos et al., 1999; Arteni et al., 2002; Demehri et al., 2003; Santos et al., 2005; Gadotti et al., 2006; Gong et al., 2006). Exibe um efeito tipo antidepressivo bem estabelecido, via receptores NMDA, L-arginina-NO, sistema noradrenérgico, serotoninérgico, opióide, imidazólicos (Zomkowski et al., 2002, 2004, 2005; Zeidan et al., 2007) e também canais de potássio, estabelecido neste estudo. Além disso, pode-se inferir, com o presente estudo, que a agmatina além do seu efeito tipo antidepressivo, apresenta também, um efeito anti-maníaco que pode ser devido, pelo menos em parte, à proteção contra a redução da atividade da bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase e contra o estresse oxidativo. Porém, o mecanismo ainda não está bem claro e há necessidade de testar seu efeito em outros modelos de mania e de estender a investigação sobre seus mecanismos de ação.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho indicam que:

- ✓ A agmatina apresenta um efeito antidepressivo no TNF por uma inibição, pelo menos em parte, dos canais de  $K^+$ ;
- ✓ A agmatina apresenta propriedade antimaníaca em um modelo de mania induzido pela administração de ouabaína e este efeito pode ser mediado, pelo menos em parte, por uma proteção contra a redução da atividade da bomba  $Na^+$ ,  $K^+$  ATPase e por uma proteção contra o estresse oxidativo.

## 8. PERSPECTIVAS

Investigações adicionais são necessárias para esclarecer muitos pontos de nossos resultados e conclusões:

- ✓ Avaliar a participação dos canais de  $K^+$  de dois poros no efeito antidepressivo da agmatina no TNF;
- ✓ Avaliar o efeito comportamental e bioquímico de doses mais baixas de agmatina no modelo animal de mania em ratos;
- ✓ Avaliar o efeito comportamental e bioquímico da agmatina no modelo animal de ouabaína em camundongos;
- ✓ Avaliar o efeito da agmatina em outros modelos animais de mania em camundongos, como no modelo animal de mania induzido por anfetamina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIYAZICIOĞLU R, KURAL B, COLAK M, KARAHAN SC, AYVAZ S, DEĞER O. Treatment with lithium, alone or in combination with olanzapine, relieves oxidative stress but increases atherogenic lipids in bipolar disorder. *Tohoku J Exp Med* 213: 79-87, 2007.

AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Washington, DC. 4<sup>th</sup> ed., 1994.

ANDERSON IM. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord* 58: 19-36, 2000.

ANDREAZZA AC, CASSINI C, ROSA AR, LEITE MC, ALMEIDA LMV, NARDIN P, CUNHA ABN, CERESÉ KM, SANTIN A, GOTTFRIED C, SALVADOR M, KAPCZINSKI F, GONÇALVES CA. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res* 41: 523-529, 2007a.

ANDREAZZA AC, FREY BN, ERDTMANN B, SALVADOR M, ROMBALDI F, SANTIN A, GONÇALVES CA, KAPCZINSKI F. DNA damage in bipolar disorder. *Psychiatry Res* 153: 27-32, 2007b.

ARBAN R, MARAIA G, BRACKENBOROUGH K, WINYARD L, WILSON A, GERRARD P, LARGE C. Evaluation of the effects of lamotrigine, valproate and carbamazepine in a rodent model of mania. *Behav Brain Res* 158: 123-132, 2005.

ARMSTEAD WM. Role of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cGMP-mediated pial artery vasodilation. *Am J Physiol* 270: 423-426, 1996.

ARTENI NS, LAVINSKY D, RODRIGUES AL, FRISON VB, NETTO CA. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. *Neurobiol Learn Mem* 78: 465-469, 2002.

BENCE AK, WORTHEN DR, STABLES JP, CROOKS PA. An in vivo evaluation of the antiseizure activity and acute neurotoxicity of agmatine. *Pharmacol Biochem Behav* 74: 771-775, 2003.

BERTON O, NESTLER EJ. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* 7: 137-151, 2006.

BILICI M, EFE H, KOROGLU MA, UYDU HA, BEKAROGLU M, DEGER O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 64: 43-51, 2001.

BOLOTINA VM, NAJIBI S, PALACINO JJ, PAGANO PJ, COHEN RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368: 850-853, 1994.

BOURIN M, PRICA C. The role of mood stabilisers in the treatment of the depressive facet

of bipolar disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 963-975, 2007.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.

BRUGUE E, VIETA E. Atypical antipsychotics in bipolar depression: neurobiological basis and clinical implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 275-282, 2007.

BUTTNER N, BHATTACHARYYA S, WALSH J, BENES FM. DNA fragmentation is increased in non-GABAergic neurons in bipolar disorder but not in schizophrenia. *Schizophr Res* 93: 33-41, 2007.

CALBERG I, MANNERNVIK B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113: 484-489, 1985.

CHEN Z, SKOLNICK P. Triple uptake inhibitors: therapeutic potential in depression and beyond. *Expert Opin Investig Drugs* 16: 1365-1377, 2007.

CHERUBINI A, RUGGIERO C, POLIDORI MC, MECOCCHI P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 39: 841-852, 2005.

CHOE S. Potassium channel structures *Nat Rev Neurosci* 3: 115-121, 2002.

CHOI JS, CHOI BH, AHN HS, KIM MJ, HAN TH, RHIE DJ. Fluoxetine inhibits A-type potassium currents in primary cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1018: 201-207, 2004.

CHRISTO PJ, EL-MALLAKH RS. Possible role of endogenous ouabain-like compounds in the pathophysiology of bipolar illness. *Med Hypotheses* 41: 378-383, 1993.

CLAPP LH. Regulation of glibenclamide-sensitive K<sup>+</sup> current by nucleotide phosphates in isolated rabbit pulmonary myocytes. *Cardiovasc Res* 3: 460-468, 1995.

CRYAN JF, MARKOU A, LUCKI I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23: 238-245, 2002.

CRYAN JF, SLATTERY DA. Animal models of mood disorders: recent developments. *Curr Opin Psychiatry* 20: 1-7, 2007.

CUI J, SHAO L, YOUNG LT, WANG JF. Role of glutathione in neuroprotective effects of mood stabilizing drugs lithium and valproate. *Neuroscience* 144: 1447-1453, 2007.

DECKER S, GRIDER G, COBB M, LI X-P, HUFF MO, EL-MALLAKH RS, LEVY RS. Open field is more sensitive than automated activity monitor in documenting ouabain-induced hyperlocomotion in the development of an animal model for bipolar illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24: 455-462, 2000.

DEMEHRI S, HOMAYOUN H, HONAR H, RIAZI K, VAFAIE K, ROUSHANZAMIR F, DEHPUR AR. Agmatine exerts anticonvulsant effect in mice: modulation by alpha 2-adrenoceptors and nitric oxide. *Neuropharmacology* 45: 534-542, 2003.

- DENNINGER J W, MARLETTA M A. Guanylate cyclase and the •NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1411: 334-350, 1999.
- DIRNAGL U, SIMON RP, HALLENBECK JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26: 248-254, 2003.
- DRINGEN R, PAWLOWSKI PG, HIRRLINGER J. Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 79: 157-165, 2005.
- DUNN AJ, SWIERGIEL AH. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 688-693, 2005.
- DUNN AJ, SWIERGIEL AH, BEAUREPAIRE R. Cytokines as mediators of depression: what can we learn from animal studies? *Neurosci Biobehav Rev* 29: 891-909, 2005.
- DWIVEDI Y, RIZAVI HS, ROBERTS RC, CONLEY RC, TAMMINGA CA, PANDEY GN. Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *J Neurochem* 77: 916-928, 2001.
- ECKELI AL, DACH F, RODRIGUES AL. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effects in mice. *Neuroreport* 11: 1839-1843, 2000.
- EINAT H, YUAN P, GOULD TD, LI J, DU J, ZHANG L, MANJI HK, CHEN G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. *J Neurosci* 23: 7311-7316, 2003.
- ELHWUEGI AS. Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 435-451, 2004.
- EL-MALLAKH RS, DECKER S, MORRIS M, LI X-P, O'MALLEY HUFF M, EL-MASRI MA, LEVY RS. Efficacy of olanzapine and haloperidol in an animal model of mania. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 1261-1264, 2006.
- EL-MALLAKH RS, EL-MASRI MA, O'MALLEY HUFF M, LI X-P, DECKER S, LEVY RS. Intracerebroventricular administration of ouabain as a model of mania in rats. *Bipolar Disord* 5: 362-365, 2003.
- EL-MALLAKH RS, HARRISON LT, LI R, CHANGARIS DG, LEVY RS. An animal model for mania: preliminary results. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 19: 955-962, 1995.
- EL-MALLAKH RS, WYATT RJ. The Na, K-ATPase hypothesis for bipolar illness. *Biol Psychiatry* 37: 235-244, 1995.
- FENG Y, LEBLANC MH, REGUNATHAN S. Agmatine reduces extracellular glutamate during pentylenetetrazole-induced seizures in rat brain: A potential mechanism for the anticonvulsive effects. *Neurosci Lett* 390: 129-133, 2005.
- FLOHÉ L, GÜNZLER WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-121, 1984.



- FRANGO S. Functional neuroimaging in mood disorders. *Psychiatry* 5: 176-179, 2006.
- FRAZER A. Pharmacology of antidepressants. *J Clin Psychopharmacol* 17 (Suppl 1): 2S-18S, 1997.
- FREY BN, ANDREAZZA AC, CERESÉR KMM, MARTINS MR, VALVASSORI SS, RÉUS GZ, QUEVEDO J, KAPCZINSKI F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci* 79: 281-286, 2006a.
- FREY BN, ANDREAZZA AC, KUNZ M, GOMES FA, QUEVEDO J, SALVADOR M, GONÇALVES CA, KAPCZINSKI F. Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 283-285, 2007.
- FREY BN, VALVASSORI SS, RÉUS GZ, MARTINS MR, PETRONILHO FC, BARDINI K, DAL-PIZZOL F, KAPCZINSKI F, QUEVEDO J. Effects of lithium and valproate on amphetamine induced oxidative stress generation in an animal model of mania *J Psychiatry Neurosci* 31: 326-332, 2006b.
- FUJINO K, NAKAYA S, WAKATSUKI T, MIYOSHI Y, NAKAYA Y, MORI H. Effects of nitroglycerin on ATP-induced  $Ca^{++}$ - mobilization,  $Ca^{++}$ -activated  $K^{+}$  channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 371-377, 1991.
- GABILONDO AM, MEANA JJ, GARCIA-SEVILLA JA. Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. *Brain Res* 682: 245-250, 1999.
- GADOTTI VM, TIBOLA D, FLAVIA PASZCUK A, RODRIGUES AL, CALIXTO JB, SANTOS AR. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. *Brain Res* 1093: 116-122, 2006.
- GALEA E, REGUNATHAN S, ELIOPOULOS V, FEINSTEIN DL, REIS DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J* 316: 247-249, 1996.
- GALEOTTI N, BARTOLINI A, GHELARDINI C. Blockade of intracellular calcium release induces an antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Neuropharmacology* 50: 309-316, 2006.
- GALEOTTI N, GHELARDINI C, CALDARI B, BARTOLINI A. Effect of potassium channel modulators in mouse forced swimming test. *Br J Pharmacol* 126: 1653-1659, 1999.
- GARERI P, FALCONI U, DE FAZIO P, DE SARRO G. Conventional and new antidepressant drugs in the elderly. *Prog Neurobiol* 61: 353-396, 2000.
- GILAD, GM GILAD VH. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. *Neurosci Lett* 296: 97-100, 2000.
- GONG Z-H, LI Y-F, ZHAO N, YANG H-J, SU R-B, LUO Z-P, LI J. Anxiolytic effect of agmatine in rats and mice. *Eur J Pharmacol* 550: 112-116, 2006.

GORDON JA, HEN R. TREKing toward new antidepressants. *Nat Neurosci* 9: 1081-1083, 2006.

GOULD TD, EINAT H, BHAT R, MANJI HK. AR-A014418, a selective GSK-3 inhibitor, produces antidepressant-like effects in the forced swim test. *Int J Neuropsychopharmacol* 7: 387-390, 2004.

GOULD TD, EINAT H. Animal models of bipolar disorder and mood stabilizer efficacy: A critical need for improvement. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 825-831, 2007.

GUO W, TODD K, BOURIN M, HASCOET M, KOUADIO F. Additive effects of glyburide and antidepressants in the forced swimming test: evidence for the involvement of potassium channel blockade. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 725-730, 1996.

GUO WY, TODD KG, BOURIN M, HASCOET M. The additive effects of quinine on antidepressant drugs in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacology* 121: 173-179, 1995.

HALARIS A, ZHU H, FENG Y, PILETZ J. Plasma agmatina and platelet imidazoline receptors in depression. *Ann N Y Acad Sci* 881: 445-451, 1999.

HARKIN AJ, BRUCE KH, CRAFT B, PAUL IA. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. *Eur J Pharmacol* 372: 207-213, 1999.

HERMAN L, HOUGLAND T, EL-MALLAKH RS. Mimicking human bipolar ion dysregulation models mania in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 874-881, 2007.

HEURTEAUX C, LUCAS G, GUY N, EL YACOUBI M, THUMMLER S, PENG XD, NOBLE F, BLONDEAU N, WIDMANN C, BORSOTTO M, GOBBI G, VAUGEOIS JM, DEBONNEL G, LAZDUNSKI M. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* 9:1134-1141, 2006.

HOLSCHER C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 20: 298-303, 1997.

HOLTZHEIMER PE III, NEMEROFF CB. Advances in the treatment of depression. *NeuroRx* 3: 42-56, 2006.

HONORÉ E. The neuronal background K<sub>2p</sub> channels: focus on TREK1 *Nat Rev Neurosci* 8: 251-261, 2007.

INAN SY, YALCIN I, AKSU F. Dual effects of nitric oxide in the mouse forced swimming test: possible contribution of nitric oxide-mediated serotonin release and potassium channel modulation. *Pharmacol Biochem Behav* 77: 457-464, 2004.

JEONG SY, HA TS, PARK CS, UHM DY, CHUNG S. Nitric oxide directly activates large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (rSlo). *Mol Cells* 12: 97-102, 2001.

KACZOROWSKI GJ, GARCIA ML. Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol* 3: 448-458, 1999.

KASTER MP, BUDNI J, BINFARÉ RW, SANTOS AR, RODRIGUES ALS. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 690-696, 2007.

KASTER MP, ROSA AO, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Involvement of nitric oxide–cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int J Neuropsychopharmacol* 8: 601-606, 2005.

KENNARD LE, CHUMBLEY JR, RANATUNGA KM, ARMSTRONG SJ, VEALE EL, MATHIE A. Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br J Pharmacol* 144: 821-829, 2005.

KIM JH, YENARI MA, GIFFARD RG, CHO SW, PARK KA, LEE JE. Agmatine reduces infarct area in a mouse model of transient focal cerebral ischemia and protects cultured neurons from ischemia-like injury. *Exp Neurol* 189: 122-130, 2004.

KOBAYASHI T, WASHIYAMA K, IKEDA K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by fluoxetine (Prozac). *Br J Pharmacol* 138: 1119-1128, 2003.

KOBAYASHI T, WASHIYAMA K, IKEDA K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by various antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology* 29: 1841-1851, 2004.

KOBAYASHI T, WASHIYAMA K, IKEDA K. Inhibition of G Protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by the antidepressant paroxetine. *J Pharmacol Sci* 102: 278-287, 2006.

KULOGLU M, USTUNDAG B, ATMACA M, CANATAN H, TEZCAN AE, CINKILINC N. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in patients with schizophrenia and bipolar disorder. *Cell Biochem Funct* 20:171-175, 2002.

LACHMAN HM, PAPOLOS DF. A molecular model for bipolar affective disorder. *Med Hypotheses* 45: 255-264, 1995.

LI R, EL-MALLAKH RS, HARRISON L, CHANGARIS DG, LEVY RS. Lithium prevents ouabain-induced behavioral changes. Toward an animal model for manic depression. *Mol Chem Neuropathol* 31: 65-72, 1997.

LI Y-F, CHEN H-X, LIU Y, ZHANG Y-Z, LIU Y-Q, LI J. Agmatine increases proliferation of cultured hippocampal progenitor cells and hippocampal neurogenesis in chronically stressed mice. *Acta Pharmacol Sin* 27: 1395-1400, 2006.

LI YF, GONG ZH, CAO JB, WANG HL, LUOI ZP, LI J. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. *Eur J Pharmacol* 469: 81-88, 2003.

MACHADO-VIEIRA R, ANDREAZZA AC, VIALE CI, ZANATTO V, CERESER V JR, DA SILVA VARGAS R, KAPCZINSKI F, PORTELA LV, SOUZA DO, SALVADOR M, GENTIL V. Oxidative stress parameters in unmedicated and treated bipolar subjects during initial manic episode: a possible role for lithium antioxidant effects. *Neurosci Lett* 421: 33-36, 2007.

- MACHADO-VIEIRA R, KAPCZINSKI F, SOARES JC. Perspectives for the development of animal models of bipolar disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 209-224, 2004.
- MACKINNON R. Potassium channels. *FEBS Lett* 555: 62-65, 2003.
- MAHER P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res Rev* 4: 288-314, 2005.
- MAKINO M, KITANO Y, HIROHASHI M, TAKASUNA K. Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. *Eur J Pharmacol* 356: 1-7, 1998.
- MANJI HK, LENOX RH. Signaling: cellular insights into the pathophysiology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 48: 518-530, 2000.
- MANJI HK, MOORE GJ, RAJKOWSKA G, CHEN G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Mol Psychiatry* 5: 578-593, 2001.
- MANJI HK, QUIROZ JA, PAYNE JL, SINGH J, LOPES BP, VIEGAS JS, ZARATE CA. The underlying neurobiology of bipolar disorder. *World Psychiatry* 2: 136-146, 2003.
- MATHIE A, VEALE EL. Therapeutic potential of neuronal two-pore domain potassium-channel modulators. *Curr Opin Investig Drugs* 8: 555-562, 2007.
- MATHIE A, WOOLTORTON JR, WATKINS CS. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol* 30: 13-24, 1998.
- MCARTHUR R, BORSINI F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective. *Pharmacol Biochem Behav* 84: 436-452, 2006.
- McINTYRE R S, FALLU A, KONARSKI, J Z. Measurable outcomes in psychiatric disorders: remission as a marker of wellness. *Clin Ther* 28: 1882-1891, 2006.
- MOINARD C, CYNOBER L, DE BANDT JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 24: 184-197, 2005.
- MÜLLER-OERLINGHAUSEN B, BERGHÖFER A, MICHAEL B. Bipolar disorder. *Lancet* 359: 241-247, 2002.
- NAIR A, VAIDYA VA. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? *J Biosci* 31: 423-434, 2006.
- NAKAGAWA Y, ISHIMA T, ISHIBASHI Y, YOSHII T, TAKASHIMA T. Involvement of GABA(B) receptor systems in action of antidepressants: baclofen but not bicuculline attenuates the effects of antidepressants on the forced swim test in rats. *Brain Res* 709: 215-220, 1996.

NELSON MT, QUAYLE JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268: 799-822, 1995.

NEMEROFF CB. The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *J Psychiatr Res* 41: 189-206, 2006.

NEMEROFF CB, OWENS MJ. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci* 5: 1068-1070, 2002.

NESTLER EJ, BARROT M, DILEONE RJ, EISCH AJ, GOLD SJ, MONTEGGIA LM Neurobiology of depression. *Neuron* 34: 13-25, 2002a.

NESTLER EJ, CARLEZON WA. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59: 1151-1159, 2006.

NESTLER EJ, GOULD E, MANJI H, BUCAN M, DUMAN RS, GERSHENFELD HK, HEN R, KOESTER S, LEDERHENDLER I, MEANEY MJ, ROBBINS T, WINSKY L, ZALCMAN S. Preclinical models: status of basic research in depression. *Biol Psychiatry* 52: 503-528, 2002b.

NICHOLSON GM, BLANCHE T, MANSFIELD K, TRAN Y. Differential blockade of neuronal voltage-gated Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels by antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol* 452: 35-48, 2002.

NJALSSON R. Glutathione synthetase deficiency. *Cell Mol Life Sci* 62: 1938-1945, 2005.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979.

OKUMA T. Effects of carbamazepine and lithium on affective disorders. *Neuropsychobiology* 27: 138-145, 1993.

OLMOS G, DEGREGORIO-ROCASOLANO N, PAZ REGALADO M, GASULL T, ASSUMPCIO BORONAT M, TRULLAS R, VILLARROEL A, LERMA J, GARCIA-SEVILLA JA. Protection by imidazoline drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. *Br J Pharmacol* 127: 1317-1326, 1999.

OZCAN ME, GULEC M, OZEROL E, POLAT R, AKYOL O. Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol* 19: 89-95, 2004.

PATEL AJ, HONORÉ E. Properties and modulation of mammalian 2P domain K<sup>+</sup> channels. *Trends Neurosci* 24: 339-46, 2001.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4<sup>th</sup> Edn. *Academic Press*, San Diego, 1998.

PERERA TD, COPLAN JD, LISANBY SH, LIPIRA CM, ARIF M, CARPIO C, SPITZER G, SANTARELLI L, SCHARF B, HEN R, ROSOKLIJA G, SACKEIM HA, DWORK AJ.

Antidepressant-induced neurogenesis in the hippocampus of adult nonhuman primates. *J Neurosci* 27: 4894-4901, 2007.

PETRIE RXA, REID IC, STEWART CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic, plasticity, and depressive disorder. A critical review. *Pharmacol Therap* 87: 11-25, 2000.

PICCHINI AM, MANJI HK, GOULD TD. GSK-3 and neurotrophic signaling: novel targets underlying the pathophysiology and treatment of mood disorders? *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 1: 419-428, 2004.

PILETZ JE, MAY PJ, WANG G, ZHU H. Agmatine crosses the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci* 1009: 64-74, 2003.

PITTENGER C, DUMAN RS. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33: 88-109, 2008.

PORSOLT RD, BERTIN A, JALFRE M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229: 327-336, 1977.

PRICE LH, HENINGER GR. Lithium in the treatment of mood disorders. *N Engl J Med* 331: 591-598, 1994.

PRINCE M, PATEL V, SAXENA S, MAJ M, MASELKO J, PHILLIPS M R, RAHMAN A. No health without mental health. *Lancet* 370: 859-877, 2007.

RAASCH W, SCHAFER U, CHUN J, DOMINIAK P. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. *Br J Pharmacol* 133: 755-780, 2001.

RANJEKAR PK, HINGE A, HEGDE MV, GHATE M, KALE A, SITASAWAD S, WAGH UV, DEBSIKDAR VB, MAHADIK SP. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res* 121: 109-122, 2003.

REDROBE JP, PINOT P, BOURIN M. The effect of the potassium channel activator, cromakalim, on antidepressant drugs in the forced swimming test in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 10: 524-528, 1996.

REIS DJ, REGUNATHAN S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci* 21: 187-193, 2000.

RODRIGUES ALS, ROCHA JBT, MELLO CF, SOUZA DO. Effect of perinatal lead exposure on rat behavior in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol* 79: 150-156, 1996.

RODRIGUES ALS, ROSA JM, GADOTTI VM, GOULART EC, SANTOS MM, SILVA AV, SEHNEM B, ROSA LS, GONÇALVES RM, CORRÊA R, SANTOS ARS. Antidepressant-like and antinociceptive-like actions of 4-(4'-chlorophenyl)-6-(4''-methylphenyl)-2-hydrazinepyrimidine Mannich base in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 82: 156-162, 2005.

- RUKTANONCHAI DJ, EL-MALLAKH RS, LI R, LEVY RS. Persistent hyperactivity following a single intracerebroventricular dose of ouabain. *Physiol Behav* 63: 403-406, 1998.
- SANTOS AR, GADOTTI VM, OLIVEIRA GL, TIBOLA D, PASZCUK AF, NETO A, SPINDOLA HM, SOUZA MM, RODRIGUES ALS, CALIXTO JB. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology* 48: 1021-1034, 2005.
- SENER G, ALTUNBAS H, ARICIOGLU-KARTAL F. The effect of agmatine on lipid peroxidation and glutathione in mice brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 11: S354, 2001.
- SHALTIEL G, CHEN G, MANJI HK. Neurotrophic signaling cascades in the pathophysiology and treatment of bipolar disorder. *Curr Opin Pharmacol* 7: 22-26, 2007.
- SHAO L, CUI J, YOUNG LT, WANG J-F. The effect of mood stabilizer lithium on expression and activity of glutathione S-transferase isoenzymes. *Neuroscience* 151: 518-524, 2008.
- SHAO L, SUN X, XU L, YOUNG LT, WANG J-F. Mood stabilizing drug lithium increases expression of endoplasmic reticulum stress proteins in primary cultured rat cerebral cortical cells. *Life Sci* 78: 1317-1323, 2006.
- SHIEH CC, MICHAEL C, SULLIVAN JP, GOPALAKRISHNAN M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 52: 557-594, 2000.
- SHIN JH, CHUNG S, PARK EJ, UHM DY, SUH SK. Nitric oxide directly activates calcium-activated potassium channels from rat brain reconstituted into planar lipid bilayer. *FEBS Lett* 415: 299-302, 1997.
- SIES H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: 291-295, 1986.
- SIMS NR, NILSSON M, MUYDERMAN H. Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. *J Bioenerg Biomembr* 36: 329-333, 2004.
- SKOLNICK P. Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol* 375: 31-40, 1999.
- STERU L, CHERMAT R, THIERRY B, SIMON P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85: 367-370, 1985.
- STOCKER M.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* 5: 758-770, 2004.
- SU R-B, WEI X-L, ZHENG J-Q, LIU Y, LU X-Q, LI J. Anticonvulsive effect of agmatine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 77: 345-349, 2004.
- TAKAHASHI T, KOBAYASHI T, OZAKI M, TAKAMATSU Y, OGAI Y, OHTA M, YAMAMOTO H, IKEDA K. G protein-activated inwardly rectifying  $\text{K}^{+}$  channel inhibition and rescue of weaver mouse motor functions by antidepressants. *Neurosci Res* 54: 104-111, 2006.
- TIERNEY JG. Treatment-resistant depression: managed care considerations *J Manag Care Pharm* 13: S2-7, 2007.

- TSANKOVA N, RENTHAL W, KUMAR A, NESTLER E J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 355-367, 2007.
- TYGAT J, MAERTENS C, DAENENS P. Effect of fluoxetine on a neuronal, voltage-dependent potassium channel (Kv1.1). *Br J Pharmacol* 122: 1417-1424, 1997.
- VAWTER MP, FREED WJ, KLEINMAN JE. Neuropathology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 48: 486-504, 2000.
- VERGARA C, LATORRE R, MARRION NV, ADELMAN JP. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8: 321-329, 1998.
- VOGALIS F, STORM JF, LANCASTER B. SK channels and the varieties of slow after-hyperpolarizations in neurons. *Eur J Neurosci* 18: 3155-3166, 2003.
- WANG JF, AZZAM JE, YOUNG LT. Valproate inhibits oxidative damage to lipid and protein in primary cultured rat cerebrocortical cells. *Neuroscience* 116: 485-489, 2003.
- WANG W, BALLTORI N. Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacol Rev* 50: 332-355, 1998.
- WANG W-P, IYO AH, MIGUEL-HIDALGO J, REGUNATHAN S, ZHU M-Y. Agmatine protects against cell damage induced by NMDA and glutamate in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1084: 210-216, 2006.
- WATSON S, GALLAGHER P, RITCHIE J C, FERRIER IN, YOUNG A H. Hypothalamic pituitary adrenal axis function in patients with bipolar disorder. *Br J Psychiatry* 184: 496-502, 2004.
- WENDEL A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77: 325-332, 1981.
- WICKENDEN A. K<sup>+</sup> channels as therapeutic drug targets. *Pharmacol Ther* 94: 157-182, 2002.
- WILLIAMS DL, KATZ GM, ROY-CONTANCIN L, REUBEN JP. Guanosine 5'-monophosphate modulates gating of high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9360-9364, 1988.
- WILLIAMS K. Modulation and Block of Ion Channels: A new biology of polyamines. *Cell Signal* 9: 1-13, 1997.
- YANG XC, REIS DJ. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 544-549, 1999.
- YEUNG SY, MILLAR JA, MATHIE A. Inhibition of neuronal KV potassium currents by the antidepressant drug, fluoxetine. *Br J Pharmacol* 128: 1609-1615, 1999.



YOUNG JW, MINASSIAN A, PAULUS MP, GEYER MA, PERRY W. A reverse-translational approach to bipolar disorder: rodent and human studies in the behavioral pattern monitor. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 882-896, 2007.

YUAN L, CHEN X. Diversity of potassium channels in neuronal dendrites. *Prog Neurobiol* 78: 374-389, 2006.

ZEIDAN MP, ZOMKOWSKI AD, ROSA AO, RODRIGUES ALS, GABILAN NH. Evidence for imidazoline receptors involvement in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Eur J Pharmacol* 565: 125-31, 2007.

ZOMKOWSKI ADE, HAMMES L, LIN J, CALIXTO JB, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport* 13: 387-391, 2002.

ZOMKOWSKI ADE, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res* 1023: 253-263, 2004.

ZOMKOWSKI ADE, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. *Neurosci Lett* 381: 279-283, 2005.